

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. M. Hannig)

Experimentelle Untersuchung zu γ -strahleninduzierten strukturellen Veränderungen des Dentins

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: Sarah Elenore Schmeer

geb. am: 07.05.1986 in Saarbrücken

Tag der Promotion:

Dekan: Univ.-Professor Dr. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Univ.-Professor Dr. Matthias Hannig

2. Berichterstatter:

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	1
2 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	3
2.1 Einführung in das Thema	3
2.1.1 Struktur des Dentins	4
2.1.2 Strahlenkaries	7
a) Definition der Strahlenkaries.....	8
b) Ätiologie und Pathogenese der Strahlenkaries.....	9
c) Prävention der Strahlenkaries.....	10
2.1.3 Wirkung der tumortherapeutischen Bestrahlung.....	11
a) Wirkung auf Haut und Schleimhäute	12
b) Wirkung auf die Speicheldrüsen	13
c) Wirkung auf den Knochen.....	14
2.1.4 Medizinische Relevanz	15
2.2 Spezielle Fragestellungen	16
3 MATERIAL UND METHODIK	17
3.1 Material.....	17
3.1.1 Probenherstellung.....	17
3.1.2 Bestrahlung.....	17
3.1.3 Thermische Wechselbelastung	18
3.1.4 Schneiden der Proben.....	18
3.2 Methodik.....	19
3.2.1 Mikrohärtemessung	19
a) Vorversuche.....	20
b) Hauptversuche	21
c) Statistische Analyse der Versuchsergebnisse	22
3.2.2 Strukturanalyse.....	23
a) Rasterelektronenmikroskopie	23
Vorversuche.....	25
Hauptversuche	27
b) Transmissionselektronenmikroskopie	28
Vorbereitung der Proben.....	29
Hauptversuche	32

4 ERGEBNISSE	33
4.1 Mikrohärtemessung.....	33
4.1.1 Statistische Analyse.....	38
4.2 Strukturanalyse.....	42
4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie.....	42
a) Struktureller Vergleich im zentralen Kronendentin	43
b) Struktureller Vergleich an der Schmelz-Dentin-Grenze	50
4.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie	55
a) Vergleich entkalkt – unentkalkt.....	55
b) Struktureller Vergleich im zentralen Kronendentin	57
5 DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG	62
5.1 Diskussion von Material und Methodik.....	62
5.1.1 Herkunft der Proben	62
5.1.2 Verwendung von Zahnpaaren	62
5.1.3 Bestrahlung.....	62
5.1.4 Thermische Wechselbelastung	63
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	64
5.2.1 Härte	64
5.2.2 Struktur.....	66
5.2.3 Schlussfolgerungen	70
6 LITERATURVERZEICHNIS	71
7 DANKSAGUNG	81
8 LEBENSLAUF	82

1 Zusammenfassung/Abstract

In der Wissenschaft sind die Ursachen des Phänomens der Strahlenkaries noch nicht vollständig aufgeklärt und werden teilweise kontrovers diskutiert. Das Krankheitsbild der Strahlenkaries äußert sich in charakteristischen Befunden, die strukturelle Veränderungen des Dentins während der Bestrahlung vermuten lassen.

Um dies zu untersuchen, sind humane, kariesfreie Zähne zunächst in einem klinisch relevanten Dosisbereich zwischen 2 und 60 Gy bestrahlt worden. Anschließend ist durch mittelbare (Härtemessungen) und unmittelbare (Elektronenmikroskopie) Methoden das dentine Kollagen auf direkte Strahlungseinflüsse systematisch untersucht worden.

Zielstellung war es, zunächst Strahlungseinflüsse auf den Mikrohärteverlauf vom Schmelz über die Schmelz-Dentin-Grenze bis ins zentrale Dentin zu untersuchen. Der Fokus dieser Arbeit lag anschließend auf der Strukturanalyse des dentinen Kollagennetzwerks hinsichtlich morphologischer und struktureller Eigenschaftsänderungen.

Es konnte gezeigt werden, dass durch alleinige Bestrahlung im gewählten Dosisbereich keine Änderungen im Härteverlauf stattfinden. Die Strukturuntersuchungen bestätigen diese Ergebnisse. Mittels Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie sind keine systematischen Veränderungen des Kollagens in Morphologie und Struktur beobachtet worden.

Da sich der Ursachenkomplex der Strahlenkaries multifaktoriell zusammensetzt, stützen die Ergebnisse dieser Arbeit den wissenschaftlichen Erkenntnisstand insofern, als dass eine Bestrahlung allein zu keinen Schädigungen der Zahnsubstanzen, insbesondere des dentinen Kollagens führt.

Abstract

Experimental study of γ -radiation-induced dentinal structural alterations

The fundamental causes of radiation-induced caries are not fully elucidated and under controversial discussion. The clinical picture shows typical findings which suggest structural changes of the dentin during irradiation.

The main purpose of the present study, therefore, was the systematic research on irradiated human caries-free teeth with respect to radiation induced structural alterations of the dentinal collagen. For this, radiation dosages of clinical relevance between 2 and 60 Gy were chosen. As a consequence of the experimental set-up, direct radiation effects were systematically considered.

The goals of the study were twofold. First, a comparison of microhardness profiles measured from the enamel across the enamel-dentin junction to the central dentin between untreated and treated teeth was done. In these experiments, the hardness was taken as an indicator for radiation induced structural changes. Second, the focus of the present study was the structural analysis of irradiated dentinal collagen. Also, comparison with the untreated reference was performed.

It was shown that the exclusive radiation in the chosen dosage range causes no changes in the microhardness profiles. The structural analysis corroborated these results. A combination of scanning and transmission electron microscopy did not reveal the presence of any systematic variation with respect to morphological or structural aspects.

It is generally accepted that radiation-induced caries is caused multifactorially. The results of the present study underline the scientific state-of-the art in the sense that the exclusive radiation does not result in destruction of dental tissues, especially of dentinal collagen.

2 Einleitung und Fragestellung

2.1 Einführung in das Thema

Tumoren im Kopf-Halsbereich stellen – mit steigender Tendenz – weltweit über 5 % aller soliden Tumoren dar. Die Therapie der malignen Tumoren in diesem Bereich wird überwiegend mit kurativer Zielsetzung durchgeführt. Therapiemethoden mit kurativem Potential sind Chirurgie und Strahlentherapie bzw. Strahlen-Chemotherapie in Kombination (Kielbassa 2004). Bei erkrankten Patienten kommen in ca. 50 % der Fälle in einer bestimmten Phase der Therapie ionisierende Strahlungen zur Anwendung (Folwacny et al. 2001). Die Patienten werden heutzutage fraktioniert bestrahlt. So wird, je nach Lokalisation und Typ des Tumors, der Patient mit 2 Gy pro Fraktion 5 Tage die Woche bestrahlt. Die Gesamtdosis beträgt bis zu 64-70 Gy (Bourhis et al. 2005).

Zusätzlich zu der Wirkung der ionisierenden Strahlung auf den Tumor haben die Strahlen auch eine Wirkung auf Haut, Schleimhäute, Speicheldrüsen, Knochen und Zähne (Barcellos-Hoff et al. 2000, Vissink A. et al 2003b, Batel-Friedrich et al. 2000). So kommt es immer wieder zu schweren, als Strahlenkaries bezeichneten Zahnschäden. Diese Strahlenkaries ist dabei nicht mit herkömmlicher Karies vergleichbar (Katz 1982, Willich et al. 1988, Rahn et al. 1989, Thiel 1989, Nilles et al. 1992, Jansma et al. 1993, Grötz et al. 1997, Kielbassa et al. 1997a, Grötz et al. 1998, Beetz et al. 1999, Kielbassa et al. 1999, Kielbassa 2000, Kielbassa et al. 2000, Grötz et al. 2001). Erstmals wurde dieser Sachverhalt im Jahre 1922 von Gotthard dargestellt. Gotthard beschrieb die für Strahlenkaries typischen Zahnschäden am Beispiel von Patienten, die aufgrund tuberkulöser Halslymphdrüsen mit hochdosierten Röntgenstrahlen behandelt worden waren. Er beobachtete erstmals Wochen bis Monate nach einer Strahlentherapie das Auftreten von Strahlenkaries. Laut neueren Studien, beispielsweise Grötz et al. (2001), kommt es bei etwa 66 % der bestrahlten Patienten trotz regelmäßiger Prophylaxe-Maßnahmen nach neun bis 18 Monaten mindestens zu einer initialen Veränderung an den Zahnhartgeweben. Selbst Patienten, bei denen über Jahre keine kariösen Läsionen auftraten, entwickelten nach einer Bestrahlung Strahlenkaries (Cooper et al. 1995). Ohne zielgerichtete Therapie führen diese Veränderungen innerhalb weniger Monate zum Zerfall der Zahnkrone (Grötz et al. 2001). Typisch sind dabei Abplatzungen des Schmelzmantels vom Dentin, vor allem im Bereich des Zahnhalses (Katz 1982, Willich et al. 1988, Jansma et al. 1993) und der Glattflächen (Grötz et al. 1997, Kielbassa et al. 1999).

Der ursächliche Zusammenhang zwischen Bestrahlung und Kariesentstehung wird bis heute kontrovers diskutiert. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich dabei auf eine systematische Untersuchung der morphologischen Änderungen in Folge einer Bestrahlung im Dentin sowie dessen mechanische Eigenschaften am Beispiel der Härte. Hierzu wird im Folgenden detailliert auf die für diese Arbeit relevanten Aspekte der Strahlenkaries eingegangen. Nach einer strukturellen Beschreibung des Dentins (Abschnitt 2.1.1) folgt die Darlegung des aktuellen Wissensstandes zum Themenkomplex der Strahlenkaries (Abschnitt 2.1.2). Anschließend wird auf die Wirkmechanismen ionisierender Strahlung auf menschliches Gewebe eingegangen (Abschnitt 2.1.3). Abschließend wird die medizinische Relevanz besprochen (Abschnitt 2.1.4).

2.1.1 Struktur des Dentins

Der größte Teil des menschlichen Zahnes besteht aus Dentin (Cooper et al. 1995). Es umgibt die Pulpa. Das koronale Dentin ist von Schmelz, das Wurzeldentin von Zahnzement bedeckt. Es ist ektomesenchymaler Herkunft und in seiner Zusammensetzung ein dem Knochen sehr ähnliches, mineralisches Gewebe (Pilz 1985). Dentin besteht zu 70 Gew.% aus anorganischem und zu 20 Gew.% aus organischem Material. Die restlichen 10 % sind Wasser (Hellwig et al. 1995). Der anorganische Anteil besteht hauptsächlich aus Phosphat, Kalzium und verschiedenen Spurenelementen. Der organische Anteil besteht zu 90 % aus Kollagen und kollagenartigen Verbindungen (Kawasaki et al. 1997). Während Zahnschmelz mit seinem anorganischen Anteil von 95 Gew.% die am stärksten mineralisierte Substanz im Körper darstellt (Wheater et al. 1987, Schroeder 1992), weist Dentin eine wesentlich geringere Vickershärte auf. Schmelz hat eine typische Vickershärte von 330-388 VHN (Johansson et al. 1998, Maupomé 1998), Dentin liegt bei einem Wert von 60-80 VHN (Schemel et al. 1984). Weiterhin kann gezeigt werden, dass die Härte von Dentin proportional mit dem Mineralisierungsgrad korreliert ist (Featherstone et al. 1983). Da Dentin im Querschnitt heterogen mineralisiert ist und damit der Mineralisierungsgrad von der Schmelz-Dentin-Grenze bis zur Pulpa variiert, ist je nach Lokalisation eine unterschiedliche Härte zu erwarten. Somit hängt die Härte per se auch von dem gewählten Messpunkt ab (Kinney et al. 2003). Im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze weist Dentin eine geringere Härte auf als im zentralen Bereich (Ogawa et al. 1983, Wang et al. 1998).

Im Gegensatz zum Schmelz ist Dentin ein lebendes, von Odontoblasten zeitlebens gebildetes Gewebe. Die Odontoblasten bilden bei der Zahnentwicklung eine Kollagenmatrix. Diese Kollagenmatrix wird anschließend zum sogenannten Orthodentin mineralisiert (Pashley 1991). Nach Abschluss der Zahnentwicklung stellen die Odontoblastenzellen die äußerste

Pulpaschicht dar und reichen mit ihren sich verzweigenden Odontoblastenfortsätzen, den sogenannten Tomes'schen Fasern, bis an die Schmelz-Dentin-Grenze heran. Diese Odontoblastenfortsätze verlaufen zusammen mit Nervenfasern in den mit Dentinliquor gefüllten Dentintubuli (Abbildung 1), welche sich ebenfalls verzweigen. Der Durchmesser und die Zahl der Dentintubuli verringern sich stetig von dem pulpanahen Dentin bis an die Schmelz-Dentin-Grenze. So finden sich pulpanah 45000 bis 65000 Tubuli pro mm^2 mit einem Durchmesser von 2 bis 3 μm . Im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze befinden sich noch 15000 bis 20000 Tubuli pro mm^2 mit einem Durchmesser von 0,5 bis 0,9 μm (Pashley 1991). Der Durchmesser verringert sich mit zunehmendem Alter (Ketterl 1961). Das Kronendentin enthält mehr Dentintubuli als das Wurzeldentin. Darüber hinaus verlaufen die Dentintubuli im koronalen Bereich s-förmig, im Wurzelbereich geradlinig nach außen (Hellwig et al. 1995). Bei mikroskopischer Betrachtung eines Dentinlängsschnittes führen die Dentintubuli zu einer Streifenbildung (Abbildung 1a). Diese Linien werden Schreger-Linien genannt (Schuhmacher et al. 1990).

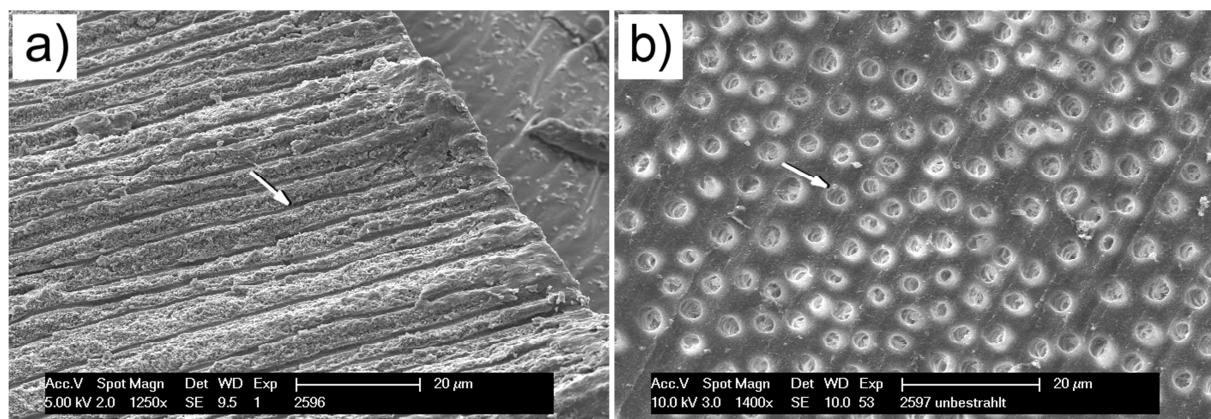


Abbildung 1: REM-Aufnahme des zentralen Kronendentins. Bei a) in 1.250facher Vergrößerung zu sehen sind Dentintubuli (→) im Längsschnitt (Schreger-Linien). Bei b) in 1.400facher Vergrößerung zu sehen sind Dentintubuli (→) im Querschnitt.

Dentin ist ein heterogenes Gewebe, wobei sowohl die Struktur als auch die Zusammensetzung sehr unterschiedlich sind. Unmittelbar im Bereich der Odontoblasten, also direkt an der Grenze zur Pulpa, liegt das Dentin in Form eines hypomineralisierten Prädentins vor. Es folgt nach einem stärker mineralisierten Zwischendentin das zirkumpulpale Dentin, welches sich wiederum in ein intertubuläres und ein peritubuläres Dentin unterscheiden lässt. Die Dentinkanälchen sind von peritubulärem Dentin umgeben (Abbildung 2). In diesem Bereich ist das Dentin am stärksten mineralisiert. Zwischen den Tubuli befindet sich das sogenannte intertubuläre Dentin, welches weit weniger mineralisiert ist und sogar zu 50 % aus kollagenem Material besteht (Hellwig et al. 1995). Bis zur Schmelz-Dentin-Grenze folgt dann das 80-100 μm dicke, weniger stark mineralisierte Manteldentin (Hellwig et al. 1995).

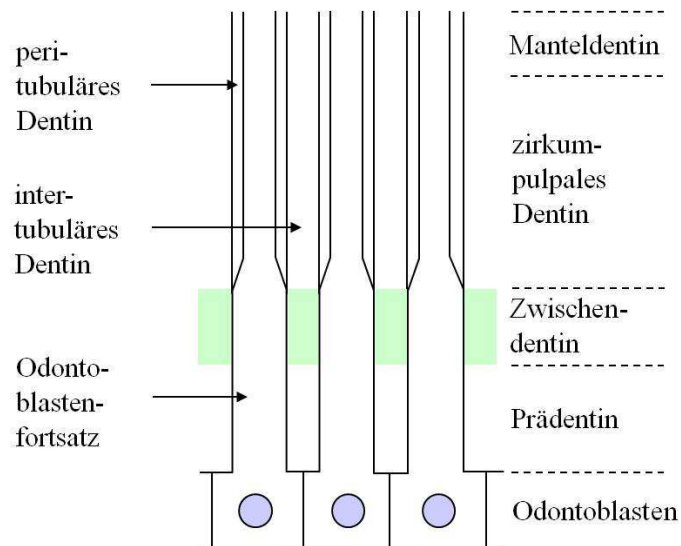


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Dentinstruktur

Lichtmikroskopisch lassen sich im Dentin darüber hinaus die Owens-Linien erkennen. Sie sind Ausdruck des periodisch verlaufenden Wachstums des Dentins (Schuhmacher et al. 1990). Des Weiteren sind sogenannte Interglobularräume erkennbar. Sie stellen Zonen unregelmäßiger Verkalkung dar. Die Tomes-Körnerschicht besteht aus einer Vielzahl solcher Interglobularräume. Sie breitet sich als schmale Zone dicht unter der Oberfläche des Wurzeldentins von der Schmelzzementgrenze wurzelspitzenwärts aus (Schuhmacher et al. 1990).

Elektronenmikroskopisch erkennt man, besonders gut im entkalkten Dentin, die vielen durchziehenden Kollagenfibrillen vom Typ I mit der charakteristischen Querstreifung (Schuhmacher et al. 1990, Marshall et al. 1997, Nalla et al. 2005). Gelegentlich sieht man Aufzweigungen von Kollagenfibrillen in Mikrofibrillen, welche ein dreidimensionales Netzwerk bilden (Schuhmacher et al. 1990). Ein Beispiel dafür zeigt Abbildung 3.

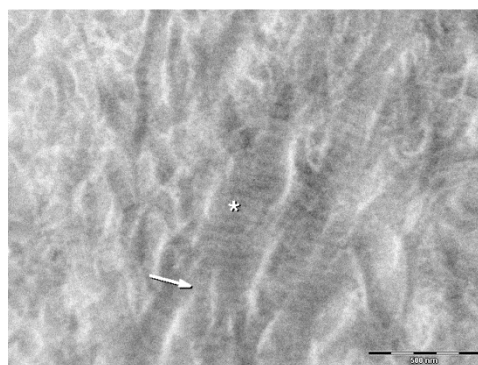


Abbildung 3: TEM-Aufnahme des entkalkten Dentins in 43.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind Kollagenfibrillen mit charakteristischer Querstreifung (*) sowie Aufzweigungen in Mikrofibrillen (→).

Im unentkalkten Dentin hingegen sieht man das anorganische Material, welches wie auch im Schmelz in kristalliner Form als Apatit bzw. amorphes Kalziumphosphat vorliegt (Hellwig et al. 1995). Apatitminerale im Dentin bestehen aus kalziumarmen und carbonatreichen Hydroxyapatitkristallen. Letztere sind dichtest gepackt (Nanci und ten Cate 2008). Die mineralisierten Kollagenfibrillen sind orthogonal zu den Dentintubuli orientiert und bilden eine ebene, filzartige Dentinmatrix zwischen den Tubuli aus (Johnes et al. 1984) (Abbildung 4).

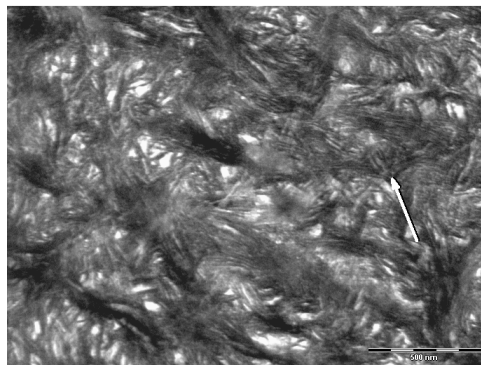


Abbildung 4: TEM-Aufnahme des unentkalkten Dentins in 43.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind die nadelartigen dicht gepackten Hydroxylapatitkristallbüschel (→).

2.1.2 Strahlenkaries

Erstmals wurde von Gotthard im Jahre 1922 das Phänomen Strahlenkaries beschrieben, wenig später von Leist (1926) und Del Regato (1939). Die Strahlenkaries unterscheidet sich dabei an vielen Stellen deutlich von der konventionellen Karies. Dieser Sachverhalt wurde bereits von vielen Autoren beschrieben (Leist 1926, Del Regato 1939, Thiel 1989, Anneroth et al. 1985, Mühlemann 1945, Pioch et al. 1997, Poyton 1968, Sonnabend 1962, Kielbassa et al. 2006). In den vergangenen 90 Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zum Themengebiet Strahlenkaries durchgeführt. Der ursächliche Zusammenhang zur Bestrahlung wird jedoch bis heute kontrovers diskutiert. Die These einer direkten strahlenbedingten Schädigung der Zahnsubstanzen steht dabei der These einer indirekten Strahlenschädigung gegenüber.

a) Definition der Strahlenkaries

Die klinischen Formen der Strahlenkaries lassen sich in vier Klassen unterteilen (Thiel 1989, Del Regato 1939):

1. Oberflächliche kariöse Zerstörung der Zahnhäule von kreidigen Verfärbungen, die bis im Endstadium zur Amputation der Zahnkrone führen.
2. Braun-schwarze Verfärbung, sich im Allgemeinen auf die gesamte Zahnoberfläche, vor allem der Molaren ausweitend, welche später unter dem Kaudruck zusammenbrechen.
3. Frühes und allmähliches Wegschmelzen der Schneidkanten und Okklusionsflächen.
4. generalisierte oberflächliche Defekte, welche als diffus punktierte, feine Läsionen der Glattflächen beginnen und später bis zum vollständigen zirkulären Schwund des Zahnschmelzes auf Gingivaniveau führen.

Grötz et al. (2001) wählt eine andere Einteilung. Diese unterscheidet sich von der von Thiel gewählten dadurch, dass erstmals Strahlenkaries in die international vereinheitlichte RTOG/EORTC¹-Klassifizierung integriert wurde. Demnach unterteilt er die Strahlenkaries in verschiedene Grade, beginnend mit Grad 0 ohne pathologischen Befund, Grad 1 flächige Verfärbungen, Grad 2 den Schmelz unterminierende Karies, Grad 3 subtotaler bis totaler Verlust und Grad 4 subtotale oder vollständige Zerstörung der Zahnkrone.

Während konventionelle Karies vorwiegend durch Demineralisation geprägt ist, kommt es bei der Strahlenkaries zu Frakturierung und großflächigen Abplatzungen des Schmelzes. Derartige Läsionen entstehen dabei auch an Stellen, die nicht als Kariesprädispositionsstellen bekannt sind, wie an Glattflächen (Schüle 1967, Sonnabend 1962, Willich et al. 1988). Der freigelegte Dentinkörper zeigt bei einer qualitativen klinischen Einschätzung Veränderungen in seiner Härte, wobei eine Sonde tiefer in das Dentin einzudringen scheint (Osswald 1963, Sonnabend 1962).

Bereits Wochen bis Monate nach der letzten Bestrahlungssitzung verliert der Schmelz seinen Glanz, die Oberfläche wirkt rau und weißlich opak. Nach einigen Monaten treten die ersten Abplatzungen auf (Osswald 1963).

Eine weitere, seltenere Veränderung des Zahnhartgewebes nach Bestrahlung sind schwarzbraune Verfärbungen. Ein Zusammenhang mit kariösen Erscheinungen konnte jedoch

¹ RTOG: Radiation Therapy Oncology Group;
EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer

widerlegt werden (Del Regato 1939, Klimm 1997, Thiel 1989). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass derartige Verfärbungen auf Zahnbeläge zurückzuführen sind, die vermutlich auf übermäßigen Tabakkonsum beruhen (Pioch et al. 1998).

Somit deuten die charakteristischen Abplatzungen des Schmelzes vom Dentin auf eine strukturelle Veränderung beziehungsweise eine Erweichung des Dentins hin.

b) Ätiologie und Pathogenese der Strahlenkaries

Die Ätiologie der Strahlenkaries wird kontrovers diskutiert. Trotz vieler Untersuchungen steht die These einer direkten radiogenen Läsion des Zahnhartgewebes (Osswald 1963, Pioch et al. 1991, Pyton 1968, Tepel et al. 1993, Willich 1988, Zampetti et al. 1973) einer indirekten Pathogenese gegenüber (Jansma et al. 1988, Jansma et al. 1990, Lehnhard et al. 1994, Rahn et al. 1989, Vogel et al. 1981).

Bei einer indirekten Pathogenese bedingt der fibrotische Umbau der Speicheldrüsen nach radiogener Sialadenitis und die dadurch entstehende Radioxerostomie die Strahlenkaries (Engelmeier et al. 1983, Frank et al. 1965, Mühlemann 1945, Rubin et al. 1976, Schüle 1967). Diese These wird auch durch einige experimentelle Ansätze belegt. Bei in vitro bestrahlten Proben lässt sich kein signifikanter Unterschied zu unbestrahlten Referenzproben finden (Jansma et al. 1988, Jansma et al. 1990, Lenhard et al. 1994, Rahn et al. 1989, Vogel et al. 1981). Jedoch ist fraglich, ob die Xerostomie alleine zur Erklärung der strahleninduzierten Karies ausreicht (Sonnabend 1962).

Willich et al. stellten in einer klinischen Untersuchung 1988 einen statistisch signifikanten erhöhten Karieszuwachs an Zähnen, die im Strahlenfeld lagen, gegenüber Zähnen außerhalb des Strahlenfeldes fest. Diese Beobachtung stützt die These einer direkten Strahlenschädigung der Zahnsubstanz. So wurde vor allem von Veränderungen im Dentin und an der Schmelz-Dentin-Grenze berichtet (Grötz et al. 1997). In Tierversuchen gelang es zu zeigen, dass Röntgenstrahlen die Odontoblasten des Dentins schädigen und eine retikuläre Atrophie der Pulpa erzeugen (Leist 1926, Leist 1927, Lüdin et al. 1936). Auch eine radiologisch bedingte Spaltung von Kollagen, wie sie in anderen Geweben vorkommt, sowie die damit verbundene Zerstörung des Kollagennetzwerkes des Dentins wurde immer wieder vermutet (Springer et al. 2005, Acil et al. 2007, Alai-Omid 2008). Eine Destruktion des Kollagens im Zahnhartgewebe konnte jedoch nicht verifiziert werden. Als mögliche Ursache geben die Autoren die relativ niedrige Konzentration dieser Proteine in Dentin und Schmelz an (Springer et al. 2005).

Eine weitere strahlenbedingte Veränderung des Dentins konnte in einer verringerten Löslichkeit des Dentins nach Bestrahlung festgestellt werden (Markitzu et al 1986), die jedoch von anderen Autoren nicht bestätigt werden konnte (Rößler et al.1995). Außerdem konnte eine Reduktion der Härte von humanem Dentin nach einer fraktionierten Bestrahlung nachgewiesen werden (Kielbassa et al. 1999, Kielbassa et al. 1997b, Fränzel et al. 2009). Diese signifikante Reduktion der Mikrohärtigkeit konnte jedoch von anderen Autoren nicht bestätigt werden (Pioch 1998, Rahn et al. 1989, Moscovich et al. 1999, Markitzu et al. 1986). Weitere Autoren fanden bei bestrahlten Patienten Spaltbildungen und lakunäre Defekte an der Schmelz-Dentin-Grenze in der Nähe kariöser Läsionen (Raab et al. 1990, Handtmann et al. 1990).

c) Prävention der Strahlenkaries

Die Prävention der Strahlenkaries unterscheidet sich kaum von der Prävention der natürlichen Karies:

- Intensive Mundhygiene,
- Chemoprävention in Form von antimikrobiellen Lösungen wie Chlorhexidin,
- regelmäßige Fluoridapplikation und
- Ernährungslenkung

sind (auch) bei der Prävention von Strahlenkaries von großer Bedeutung. Lediglich die Fissurenversiegelung spielt im Gegensatz zur natürlichen Karies eine untergeordnete Rolle, da die Strahlenkaries bevorzugt an Glattflächen auftritt.

Diese prophylaktischen Maßnahmen sollten vor, während und nach der Bestrahlung stattfinden (Thiel 1989, Jansma et al. 1992a, Jansma 1992b).

Der Patient sollte bereits vor Beginn der Bestrahlung ausführlich aufgeklärt, informiert und zu einer optimalen Mundhygiene geführt werden (Horiot et al. 1997, Wescott et al. 1975). Vor der Radiotherapie ist eine komplette Sanierung des Zahnsystems empfehlenswert (Horiot et al. 1997, Lockhart et al. 1994). Nach der Bestrahlung ist ein engmaschiger Recall angeraten, um eine optimale Mundhygiene möglichst lebenslang aufrechtzuerhalten und um beim Auftreten von Strahlenkaries frühzeitig konservierende Maßnahmen ergreifen zu können (Thiel 1989). Auch im Sinne einer Rezidivkontrolle im Bereich des Mundes ist ein engmaschiger Recall empfehlenswert. (Jansma et al. 1992b)

Des Weiteren empfehlen Beetz et al. (1999) die tägliche Anwendung hochdosierten Fluoridgels für mindestens 5 Minuten. Besonders bei stark ausgeprägter Xerostomie konnte gegenüber der Anwendung fluoridhaltiger Mundspüllösungen durch die Applikation über eine

Fluoridierungsschiene ein deutlich geringerer Kariesanstieg verzeichnet werden. Darüber hinaus ist die Anwendung von Chlorhexidinpräparaten zur Reduktion von *Streptococcus mutans* (Emilson 1994) empfehlenswert. Trotz intensiver mechanischer und chemischer Mundhygiene und umfangreicher Fluoridierungsmaßnahmen kann der Verfall der Zähne nur verzögert, nicht jedoch wirklich aufgehalten werden (Wöstmann et al. 1995, Grötz et al. 2001).

Bezüglich der Ernährung ist es wichtig, dass die Patienten genügend Flüssigkeit zu sich nehmen. Eine verminderte Flüssigkeitszufuhr allein kann schon eine verminderte Speichelfließrate zur Folge haben (Nagler et al. 1996). Ferner sollte die häufige Zufuhr niedermolekularer Kohlenhydrate, welche zu einem Anstieg kariogener Mikroorganismen führen, vermieden werden. Auch stark erosive Getränke sollten auf Grund der fehlenden oder verminderten remineralisierenden Wirkung des Speichels gemieden werden (Rateitschak et al. 1988). Von Beetz et al. (1999) wird darüber hinaus der Verzehr von Hartkäse vorgeschlagen, da der Speichelfluss stimuliert wird und es zur Freisetzung remineralisierender Substanzen wie Casein, Phosphat und Kalzium kommt. Auch Sela et al. (1994) bestätigten, dass bestimmte Ernährungsgewohnheiten und Nahrungsmittel wie Käse auf die Dynamik des radiogenen Zahnzerfalls einwirken.

Da die Bestrahlung zu einer Schwächung der körpereigenen Abwehr und so mit einem erhöhten Risiko einer infizierten Osteoradionekrose einhergeht (Grötz et al. 1999), sollten infektionsträchtige Eingriffe im Rahmen der Sanierung des Zahnsystems, wie Zahnextraktionen oder parodontalchirurgische Behandlungen ca. 1-2 Wochen vor der Bestrahlung stattfinden. Um späteren infektionsträchtigen Eingriffen vorzubeugen, sollte vor der Bestrahlung eine komplette Sanierung des Zahnsystems mit strenger Indikation zum Zahnerhalt erfolgen (Grötz et al. 2001). Zahlreiche Autoren empfehlen daher, vor der Strahlentherapie radikal alle vorgeschädigten Zähne zur Vermeidung einer infizierten Osteoradionekrose zu extrahieren (Schüle 1967, Marciani et al. 1992, Thiel 1989, Wagner et al. 1986).

2.1.3 Wirkung der tumortherapeutischen Bestrahlung

In der modernen Radioonkologie werden hochenergetische Teilchenstrahlungen in Form von einer Photonen- oder Korpuskularstrahlung eingesetzt. Dies ermöglicht eine homogene Applikation der therapeutisch erforderlichen Dosis im Bereich des so genannten Zielvolumens, das den Tumor und einen Sicherheitssaum umfasst. Durch eine sorgfältige Bestrahlungsplanung, basierend auf CT-, MRT- sowie Röntgenaufnahmen in enger Kooperation von Medizinphysikern und Radioonkologen wird versucht, die das Zielvolumen

umgebenden gesunden Organe und Gewebe so wenig wie möglich mit Strahlung zu belasten (Kielbassa 2004). Trotz all dieser Bemühungen ist eine vollständige Abschirmung der gesunden Nachbarstrukturen aufgrund der anatomischen Gegebenheiten praktisch unmöglich. So kommt es regelmäßig zu ungewollten radiogenen Veränderungen des ursprünglich gesunden Nachbargewebes (Cooper et al. 1995, Dirix et al. 2006).

Die radioaktive Strahlung ionisiert in einer Körperzelle direkt oder indirekt Atome und Moleküle. Dabei entstehen chemisch sehr aggressive Stoffe wie Zellgifte und freie Radikale. Diese blockieren dann über weitere im Einzelnen noch wenig bekannte chemische Reaktionen die für die Zelle lebenswichtige DNS-Synthese. Die Folge ist der Strahlentod der Zelle (Vogel et al. 1999). Bei geringeren Dosen wird eine funktionelle oder strukturelle Veränderung der Zelle (Kielbassa 2004) induziert. Das höchste zerstörerische Potential ionisierender Strahlen wird in der Mitosephase der Zelle bzw. im Zeitraum kurz vor der Zellteilung erreicht. Deshalb sind in besonderem Maße Zellen davon betroffen, die sich häufig teilen (Cooper et al. 1995).

a) Wirkung auf Haut und Schleimhäute

Bei 90-100 % der bestrahlten Patienten, bei denen die Mundhöhle im Strahlenfeld liegt, kommt es zu oralen Komplikationen (Herrstedt 2000). Die Ursache dafür liegt laut Sciubba et al. (2006) einerseits in der Tatsache begründet, dass sich die Zellen der Mukosa sehr häufig teilen und damit besonders empfindlich gegenüber Strahlung sind, andererseits aber auch an der komplexen Mundflora und an häufig auftretenden kleinen Verletzungen der Mundschleimhaut, die auch beim normalen Essen entstehen können. So kommt es bereits in der zweiten bis dritten Bestrahlungswoche zu ersten Akutantworten der Mundschleimhaut (Sciubba et al. 2006). Dabei entsteht meist zunächst eine herdförmige, später konfluierende sehr schmerzhaftes Mukositis, teilweise auch mit pseudomembranös belegten Schleimhautulcerationen (Rubin et al. 1976, Thiel 1989). Darüber hinaus kommt es zu einem Rückgang von ca. 30 % der Sinneszellen des gustatorischen Organs (Folwaczny und Hickel 2001) und damit zur vorübergehenden Minderung des Geschmacks- und Geruchssinnes (Schiødt 2002, Vissink et al. 2003a). Diese Akutantworten sind für die Patienten sehr unangenehm, jedoch innerhalb von zwei bis vier Wochen nach Abschluss der Strahlentherapie normalerweise reversibel (Sciubba et al. 2006, Schiødt 2002). Allerdings bleibt das regenerative Potential der Mukosa meist dauerhaft eingeschränkt (Eggert et al. 1985, Folwaczny und Hickel 2001).

Auch die Haut zeigt eine Akutantwort auf die Bestrahlung mit erythematösen bzw. desquamativen Reaktionen sowie mit dem Verlust der Hautanhangsgebilde.

Chronische Erscheinungen oder Spätfolgen der Strahlentherapie können sich noch Wochen bis Jahre nach der eigentlichen Strahlentherapie manifestieren (Sciubba et al. 2006). Dazu zählen atrophische Haut- und Schleimhautveränderungen mit Teleangiektasien und vereinzelt Ulzerationen (Schüle 1967, Cooper et al. 1995).

b) Wirkung auf die Speicheldrüsen

Bereits Del Regato beschrieb 1939, dass die Strahlenkaries auch an Zähnen auftritt, die nicht im Strahlenfeld liegen. So konnte er bei Patienten, die im Bereich der Molaren bestrahlt wurden, Strahlenkaries auch an den Schneide- und Eckzähnen beobachten. Als Ursache diskutierte er eine Strahlenwirkung auf das Gefäßsystem und die Knochenstruktur. Als wesentlichen Faktor stellte er dabei jedoch die Bestrahlung der Speicheldrüsen mit daraus resultierender Änderung der Speichelsekretion heraus. Seine Beobachtung wurde im Jahre 1965 von Frank et al. bestätigt. Die Autoren folgerten, dass das Speicheldrüsen- und die Speichelsekretion von fundamentaler Bedeutung für die Zahngesundheit sind.

Beim Gesunden produzieren die Speicheldrüsen je nach Stimulation ca. 1 Liter Speichel pro Tag (Hellwig et al. 1995). Davon werden 60-65 % von der Glandula parotidea, 20-30 % von der Glandula submandibularis und 2-5 % von der Glandula sublingualis gebildet (Cooper et al. 1995).

Dem Speichel kommen eine Reihe wichtiger Funktionen zu. Er hat Spülfunktion und ermöglicht dadurch eine gewisse Selbstreinigung der Mundhöhle. Der pH-Wert des unstimulierten Speichels liegt bei 6,5-6,9, der pH-Wert des stimulierten Speichels liegt bei 7,0-7,5 (Hellwig et al. 1995). Er enthält unterschiedliche Puffersysteme. Der wichtigste ist dabei der Bicarbonatpuffer. Diese Puffer verhindern, dass der pH-Wert nach der Nahrungsaufnahme durch die bakterielle Metabolisierung niedermolekularer Kohlenhydrate in einen kritischen Bereich von unter 5,5 fällt (Hellwig et al. 1995). Gleichzeitig dienen die im Speichel enthaltenen Kalzium-, Phosphat- und Fluoridionen der Remineralisation (Klimek 1997). Des Weiteren enthält der Speichel antibakterielle Substanzen wie Lysozym und Lactoferrin. Ebenfalls enthaltene Immunglobuline schützen Schleimhaut und Zähne vor Bakterien (Jentsch et al. 1991). Auch an der Pellikelbildung und den damit verbundenen protektiven Eigenschaften wie Lubrikantbildung, Erosionsschutz sowie Regulation des Mineralhaushaltes ist der Speichel beteiligt (Hannig und Hannig 2007). Eine entscheidende Rolle spielt der Speichel auch bei der Verdauung. Die in ihm enthaltene α -Amylase leitet den Abbau von Stärke und Glycogen ein (Thiel 1989).

Diese natürlichen Funktionen des Speichels werden in Folge einer Bestrahlung verändert. Nach Abschluss einer radiologischen Bestrahlung sinkt die Menge des Speichels signifikant

(Engelmeier et al. 1983, Willich et al. 1988, Spak et al. 1994, Cooper et al. 1995, Dirix et al. 2006, Katz 1982). Im Gegensatz dazu steigt die Viskosität (Cooper et al. 1995). Außerdem ändert sich der Speichel in seiner Zusammensetzung (Hannig et al. 2006, Dreizen 1976, Frank et al. 1965, Rahn et al. 1989, Thiel 1989).

All diese Speichelveränderungen bewirken eine massive Einschränkung der protektiven Speichelfunktionen, was zu einer Veränderung der natürlichen oralen Flora führt (Brown 1975). Zu den wesentlichen Veränderungen zählt dabei der Anstieg kariogener Mikroorganismen wie *Streptococcus mutans* (Keene et al. 1981).

Des Weiteren beklagen die Patienten Probleme beim Sprechen, Kauen, Schmecken und Schlucken. Auch der Prothesenhalt von gingival gelagerten Totalprothesen ist auf Grund der Mundtrockenheit deutlich beeinträchtigt (Matzker et al. 1972).

c) Wirkung auf den Knochen

Liegt der Knochen bei einer tumortherapeutischen Bestrahlung im Strahlenfeld, so kommt es zu einer irreversiblen Schädigung der Osteozyten und Osteoblasten sowie der versorgenden Blutgefäße (Rubin et al. 1976). Die Folge ist eine verminderte Abwehrmöglichkeit des Knochens gegenüber eindringenden Keimen sowie ein erhöhtes Infektrisiko mit verminderter Regenerationsleistung. Die schwerwiegendste potentielle Komplikation der Bestrahlung ist damit die infizierte Osteoradionekrose, die zu starken Schmerzen und Spontanfrakturen des rarefizierten Knochens führen kann (Cooper et al. 1995). Eine Osteoradionekrose tritt im Unterkiefer bei 2,6-22 % der Patienten auf, im Oberkiefer ist eine Osteoradionekrose wesentlich seltener (Vissink et al. 2003b). So traten in einer klinischen Langzeitstudie über 80 % der Osteoradionekrosefälle im Unterkiefer auf. Die Ursache wird in der alleinigen Versorgung des Unterkiefers durch die Arteria alveolaris inferior vermutet (Folwaczny et al. 2001). Grötz et al. (2001) beobachteten in einer retrospektiven Studie, dass sogar 91 % der infizierten Osteoradionekrosen im Unterkiefer auftreten. Die infizierte Osteoradionekrose wird in fast 70 % der Fälle durch dentogene Infektionen ausgelöst (Grötz et al. 1994). Als Eintrittspforten für Mikroorganismen kommen insbesondere tiefe kariöse Läsionen mit anschließender Pulpanekrose, profunde und apikale Parodontopathien, Prothesendruckstellen sowie infizierte Extraktionswunden in Betracht (Filippi et al. 1993, Eggert et al. 1985, Fujita et al. 1986, Herzog et al. 1986). Die Behandlung der Osteoradionekrose gestaltet sich schwierig. Oft wird eine Resektion des betroffenen Knochens notwendig. Umso wichtiger sind die Prävention mit einer kompletten Zahnsanierung vor der Strahlentherapie, bei der alle Zähne mit zweifelhafter Prognose extrahiert werden sollten, sowie ein regelmäßiger Recall nach der Bestrahlung (Vissink et al. 2003a).

2.1.4 Medizinische Relevanz

Die Relevanz der Strahlenkaries geht über ein rein zahnärztliches Problem hinaus. Retrospektive Untersuchungen zur Ätiologie der infizierten Osteoradionekrosen des Kiefers haben ergeben, dass diese in zwei Dritteln der Fälle durch dentogene Infektionen verursacht sind, die in kausalem Zusammenhang mit Strahlenkaries stehen (Grötz et al. 1994). Dabei wird diese Untersuchung auch durch andere Angaben in der Literatur belegt (Vogel et al. 1981). Demnach stellt eine ausgedehnte präradiotherapeutische Zahnsanierung mit großzügiger Indikationsstellung zur Extraktion eine übliche Osteoradionekroseprophylaxe dar (Engelmeier et al. 1983). Die damit einhergehende eingeschränkte kaufunktionelle und damit auch psychosoziale Rehabilitation von Patienten mit geringer Restbezahnung und Radioxerostomie nach einer Bestrahlung sowie die verminderter Prothesenadaptationsfähigkeit bestrahlter Patienten haben im Laufe der Zeit dazu geführt, dass heute immer mehr prognostisch besser bewertete Zähne nicht extrahiert werden. Zum Zweck der Verankerungsmöglichkeit von Zahnersatz werden letztere im Mund belassen. Auch retrospektive Studien zeigen bislang keine erhöhte infizierte Osteoradionekroseinzidenz (Grötz et al. 1994). Somit gewinnen prophylaktische Maßnahmen deutlich an Bedeutung. Standardisierte Recallprogramme mit Intensivierung der Mundhygienemaßnahmen sowie lokaler Fluoridierung werden beschrieben (Epstein et al. 1986, Kärcher 1984, Marciani et al. 1974). Jedoch liegt, solange die Ursache der Strahlenkaries nicht eindeutig geklärt ist, kein kausal orientierter Therapie- oder Prophylaxeansatz vor. Somit zeigt sich immer wieder, dass bezüglich der Überlebensrate von Zähnen, die bei einer Kopf-Halsbestrahlung im Strahlenfeld lagen, keine gute Prognose abgegeben werden kann (Wöstmann et al. 1995). Umso wichtiger erscheint die Erforschung der eigentlichen Ursache der Strahlenkaries.

2.2 Spezielle Fragestellungen

Die steigende Inzidenz der Tumoren im Kopf-Hals-Bereich und die damit verbundene Bestrahlung als unverzichtbarer Bestandteil des Therapiespektrums (Grötz et al. 2001), werfen immer wieder das Problem Strahlenkaries auf. Trotz umfangreicher Prophylaxemaßnahmen lässt sich eine Strahlenkaries bisher nicht völlig vermeiden (Wöstmann et al. 1995, Grötz et al. 2001). Selbst nach umfangreichen Studien in der Vergangenheit ist die Ursache des Phänomens Strahlenkaries noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein grundlegendes Verständnis dieses Phänomens ist jedoch die Voraussetzung für eine erfolgreich Behandlung, beziehungsweise eine Vermeidung dieser Kariesform. Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, äußert sich das Krankheitsbild der Strahlenkaries in charakteristischen Befunden, die strukturellen Veränderungen des Dentins während der Bestrahlung vermuten lassen. Für die vorliegende Arbeit ergeben sich daraus folgende Fragestellungen.

Fragestellung 1

Bei der Strahlenkaries lässt sich häufig ein Abscheren des Schmelzmantels vom Dentin beobachten (Osswald 1963, Thiel 1989), der Dentinkern erscheint beim Sondieren erweicht (Sonabend 1962, Osswald 1963). All diese Tatsachen sprechen dafür, dass Dentin bei der Bestrahlung eine strukturelle Änderung erfährt und deshalb an Härte verliert. Dabei gibt es sowohl Studien, die einen Verlust an Härte beschreiben, als auch Studien, die keinen Härteverlust feststellen können. In diesem Kontext stellt sich zunächst die folgende Frage: Ändert sich durch Bestrahlung der Härteverlauf über die Schmelz-Dentin-Grenze?

Fragestellung 2

Wie einleitend beschrieben, ist zu vermuten, dass Veränderungen in der Mikrostruktur des Dentins während der Bestrahlung die Ursache für die beschriebenen Beobachtungen sind. Aktuelle Studien zu diesem Thema bestätigen diese Vermutung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es bei einer Bestrahlung zu einer biochemisch nachweisbaren Destruktion von Kollagen im Knochen, in der Haut und im Periost (Acile et al. 2007) sowie im Bereich der Zahnpulpa kommt (Springer et al. 2005). Eine Destruktion des Kollagens im Zahnhartgewebe konnte jedoch bisher mit ultrastrukturellen Methoden noch nicht verifiziert werden. Somit ergibt sich für diese Arbeit eine zweite Fragestellung:

Führt die Bestrahlung auch zu einer systematischen Destruktion des Kollagens im Dentin und ist daraufhin eine ultrastrukturelle Veränderung zu beobachten?

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Probenherstellung

Um eine möglichst präzise Aussage über strukturelle Veränderungen im Dentin treffen zu können, wurden paarweise frisch extrahierte kariesfreie Weisheitszähne von jeweils einem Patienten gesammelt. Die Zähne wurden von Geweberesten befreit, sofort in 25%igem Alkohol zwischengelagert und bis zur Weiterbearbeitung bei -81°C gelagert. Den Weisheitszahnpaarchen wurde, um eine Verwechslung im weiteren Verlauf auszuschließen, eine Nummer eingraviert. Somit war jedem Zahn sein Partnerzahn vom selben Patienten verwechslungsfrei zuzuordnen.

3.1.2 Bestrahlung

Jeweils ein Zahn der Weisheitszahnpaarchen wurde zur Bestrahlung vorbereitet. Dazu wurden die Zähne, um ein umgebendes Gewebe zu simulieren, vollständig in Impregum (3M ESPE Seefeld) eingebettet. Die Proben waren auf der Seite der Strahlenquelle von einer definierten 1,5 cm starken Impregumschicht bedeckt (Abbildung 5).



Abbildung 5: Zähne eingebettet in Impregum. Die Abbildung zeigt die Situation vor einer weiteren Bedeckung mit Impregum.

Anschließend wurden die Zähne mit Photonen-Strahlen bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte am Linearbeschleuniger Mevatron MDX (bzw. Mevatron MXD im Falle der 60-Gy-Gruppe) der Firma Siemens mit einer Photonengrenzenergie von 6 MeV.

Um mögliche Veränderungen sowohl bei hohen Strahlendosen als auch bei geringerer Strahlendosis zu beurteilen, wurden die Zähne in verschiedene Dosisgruppen mit jeweils 7 Zähnen eingeteilt. Die verschiedenen Gruppen wurden mit Einzeldosen von 2, 5, 10, 20 und 60 Gy bestrahlt.

Nach der Bestrahlung wurden die Proben direkt aus dem Impregum entnommen und in 0,1 %igem Thymol gelagert. Somit konnten die Zähne optimal feucht gehalten und durch Thymol eine Zersetzung des Pulpagewebes verhindert werden. Auf der anderen Seite war die Thymolkonzentration so gering, dass nicht mit Veränderungen im Dentin und Schmelz zu rechnen ist.

Auch die unbestrahlten Partnerzähne wurden ab diesem Zeitpunkt in 0,1 %igem Thymol gelagert.

3.1.3 Thermische Wechselbelastung

Um eine Zahnalterung zu simulieren, wurden die Zähne in 10 Fraktionen für insgesamt 10.000 Zyklen thermisch wechselbelastet. Diese Zyklenzahl stellt eine Zahnalterung von circa einem Jahr dar (Xu et al. 2002, Gale et al. 1999). Ein Zyklus umfasste 1 min bei 5° C sowie eine weitere Minute bei 55° C. Anschließend wurden die Zähne für 6 Monate in 0,1 %igem Thymol im Inkubator bei 37° C gelagert.

3.1.4 Schneiden der Proben

Um einen möglichst großen Nutzen von den aufwendig gesammelt und bestrahlten Proben zu haben, wurden alle Zähne mithilfe einer wassergekühlten Säge (IsoMet low speed saw, Bühler 5 Umdrehungen pro Minute) mehrfach geschnitten. Ein Diamantsägeblatt wurde dafür verwendet. Schematisch ist die Probenpräparation in Abbildung 6 zusammengefasst.

Im 1. Trennschnitt wurde die Zahnkrone oberhalb der Pulpa geteilt, sodass letztere nicht eröffnet wurde.

Im 2. Trennschnitt wurde eine 5 mm dicke Scheibe der abgetrennten Zahnkrone abgeschnitten.

Im Anschluss wurde aus dem Scheibchen mithilfe eines Trepanbohrers unter Wasserkühlung ein Dentinscheibchen herauspräpariert. An diesem wurden die Strukturanalysen im TEM durchgeführt.

An dem verbliebenen koronalen Anteil wurden die Mikrohärtemessungen sowie die Strukturanalyse im REM durchgeführt.

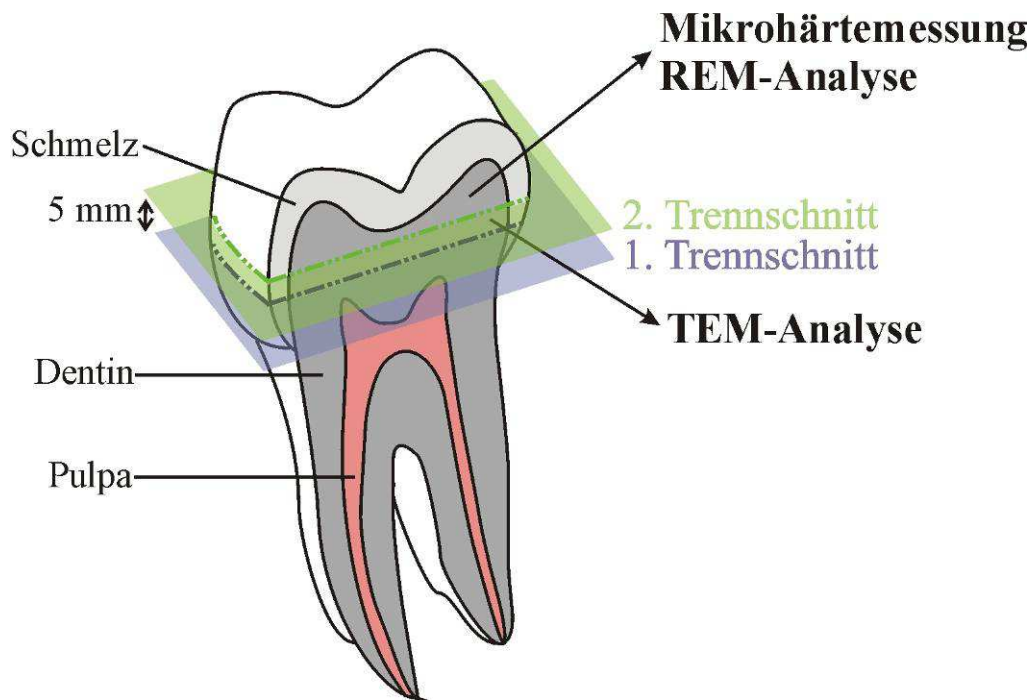


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Probenpräparation im Kronenbereich. Im zentralen Kronenbereich wird eine 5 mm dünne Scheibe zur weiteren TEM-Präparation entnommen. Am restlichen koronalen Anteil werden die Härte- und REM-Untersuchungen durchgeführt.

Zwischen den einzelnen Untersuchungen wurden die Proben in 0,1 %igem Thymol im Kühlschrank bei 8° C gelagert.

Die so vorbereiteten Proben wurden häufig in der vorliegenden Arbeit verwendet. In einer zu dieser Arbeit ergänzenden Studie, in der die Verteilung und Aktivität von Matrix-Metallo-Proteasen im Dentin untersucht worden sind, wurden die verbliebenen Proben analysiert (Hackethal 2013).

3.2 Methodik

3.2.1 Mikrohärtemessung

Die Mikrohärtemessung ist ein Werkstoffprüfverfahren, bei dem ein Prüfkörper in die zu untersuchende Probe eingedrückt und aus dem Quotienten aus wirkender Kraft F und dem erzeugten Eindruck der Härtewert ermittelt wird. Als Prüfkörper wird in der Regel eine Diamantpyramide mit einem Flächenöffnungswinkel von $136^\circ \pm 2$ eingesetzt. Damit erhält die Mikrohärte die gleiche Definition, wie sie für die Makrohärte getroffen wurde. Das Verfahren der Mikrohärtebestimmung ist mit dem Vickers-Verfahren vergleichbar. Die applizierten Kräfte liegen für die Mikrohärtemessung zwischen 0,09807 und 1,961 N. Nach

Rücknahme der Prüfkraft werden am Eindruck die Diagonalen d_1 und d_2 vermessen, der entsprechende Mittelwert gebildet und daraus die Fläche berechnet (Abbildung 7). Die Eindringtiefe der Pyramide ist dabei immer kleiner als $1/7$ der Diagonalen.

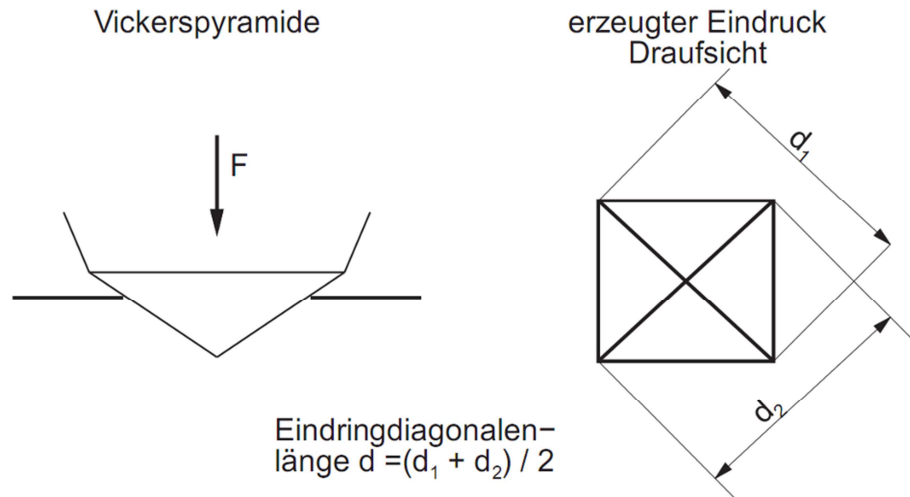


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Mikrohärtmessung nach Vickers. Eine Diamantpyramide wird mit einer Kraft F in den Prüfkörper gedrückt. Anschließend wird der Eindruck vermessen und mit diesen Werten die Härte berechnet.

Der Prüfkörper hat dabei sehr geringe Abmessungen von < 1 mm Seitenlänge an der Pyramidenbasis. Hierdurch liegt eine signifikant höhere lokale Auflösung der Härtemessung vor, verglichen mit Methoden der klassischen Makrohärtebestimmung. Letztere messen einen integralen Härtewert über einen großen Gefügebereich der untersuchten Probe. Vor dem Hintergrund der höheren lokalen Auflösung eignet sich das Verfahren der Mikrohärtmessung zur Vermessung von Härteverläufen. Dies wird in dieser Arbeit ausgenutzt (Seidel 2007).

a) Vorversuche

Erste Versuche zeigten, dass Mikrohärtmessungen an unpolierten Proben nicht möglich waren, da aufgrund der Oberflächenrauheit keine Abdrücke zu sehen waren. Somit war es erforderlich, die geschnittene Oberfläche zunächst zu polieren. In den Vorversuchen zur Mikrohärtmessung wurde der optimale Grad der Oberflächenpolitur bestimmt sowie eine Probenhalterung zum planparallelen Ausrichten während der Messung entwickelt.

Das Polieren wurde mithilfe eines Poliermotors mit Wasserkühlung und Siliziumcarbid-Polierpapier (Buehler GmbH, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Politur mit einer Körnung von 4000 für eine Minute die Oberfläche am besten für die Mikrohärtmessung vorbereitete. Anschließend wurden die Prüfkörper auf einem Kompositbett (Herculite, Kerr Corporation) mithilfe von Objektträgern planparallel

ausgerichtet und befestigt. Um den Zahn vor Austrocknung zu schützen, wurde der Kunststoff von unten mithilfe einer Lichthärtelampe für eine Dauer von 30 Sekunden ausgehärtet. Um ein zu starkes Austrocknen der Proben während des Versuches zu verhindern, wurde die Befestigung im Kunststoffbett unmittelbar vor jeder Messung durchgeführt. Zusätzlich wurde der Zahn, bis die Messung startete, kontinuierlich feucht gehalten.

b) Hauptversuche

Die Hauptversuche hatten das Ziel, einen möglichen Einfluss von γ -Strahlung auf die mechanischen Eigenschaften der Zahnschubstanz am Beispiel der Härte zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die mit unterschiedlichen Dosisleistungen bestrahlten Zähne entsprechend den Vorversuchen zur Mikrohärtemessung (vgl. Abschnitt 3.2.3) vorbereitet und an jeder Probe an acht unterschiedlichen Orten Härteverläufe vom Zahnschmelz über die Schmelz-Dentin-Grenze bis ins Dentin hinein vermessen. Das Messprinzip ist in Abbildung 8 b) abgebildet.

Die Messungen wurden mit einem Mikrohärteprüfer des Typs Duramin (Struers) durchgeführt (Abbildung 8 a). Die Kraft, mit der die Diamantpyramide eindringt, wurde auf 981,2 mN festgesetzt. Die Eindringzeit betrug zehn Sekunden. Die Fläche wurde mit einem 40fach vergrößernden Objektiv ausgemessen.

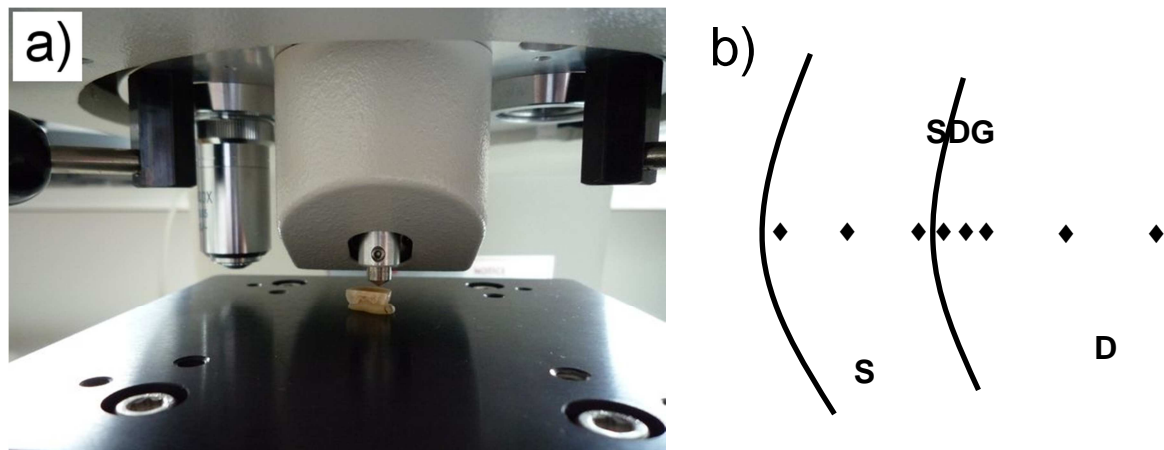


Abbildung 8: a) Situation während einer Härtemessung. Zu sehen ist eine auf einem Kompositbett befestigte Kronenhälfte. Die Diamantpyramide wird gerade abgesenkt. b) Schematische Darstellung der Messpunkte. Zu sehen sind Schmelz (S), Dentin (D), sowie die Schmelz-Dentin-Grenze (SDG). Die Punkte (◆) geben schematisch die fortlaufenden Messpositionen 1-8 wieder. Wobei Position 1 im äußeren Schmelz und Position 8 im zentralen Dentin liegt.

Es wurden folgende Zähne untersucht:

Tabelle 1: Anzahl der mittels Mikrohärte untersuchten Zähne in den drei Bestrahlungsgruppen.

Strahlendosis [Gy]	Anzahl der Zähne
10	14
20	14
60	14

c) Statistische Analyse der Versuchsergebnisse

Die Mikrohärtemessungen wurden an 21 Zahnpaaren durchgeführt.

In der statistischen Auswertung wurden zunächst die verschiedenen Messpunkte der bestrahlten und unbestrahlten Proben miteinander verglichen. Anschließend wurden die Messpunkte jeweils für Schmelz und Dentin gepoolt und im bestrahlten und unbestrahlten Zustand miteinander verglichen. Das Zusammenfassen der Messwerte ist aufgrund der klinisch nicht relevanten Differenz in den Härtewerten zulässig.

Mit den gepoolten Daten wurden folgende statistische Fragen (Nullhypothese) beantwortet:

1. Ist die Mikrohärte an Schmelz und Dentin unabhängig von der Bestrahlung?
2. Ist die Mikrohärte an Schmelz und Dentin unabhängig von der Bestrahlungsdosis?

Es wurden ausschließlich parametrische Testverfahren eingesetzt, da es sich um Messwerte handelt. Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit einem T-Test für verbundene Stichproben.

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgesetzt. Als Software wurde das Programm SPSS 19 verwendet.

3.2.2 Strukturanalyse

Um eine Aussage über strukturelle Unterschiede zwischen unbestrahltem und bestrahltem Dentin treffen zu können, wurden sowohl rasterelektronenmikroskopische als auch transmissionselektronenmikroskopische Vergleichsstudien durchgeführt. Sie erlaubten eine lokale strukturelle Untersuchung mit höchster Ortsauflösung.

a) Rasterelektronenmikroskopie

In einem Rasterelektronenmikroskop (REM) wird ein Elektronenstrahl erzeugt und mittels eines Systems aus magnetischen oder elektrostatischen Linsen auf die zu untersuchende Probe fokussiert. Abbildung 9 zeigt den schematischen Aufbau eines REM.

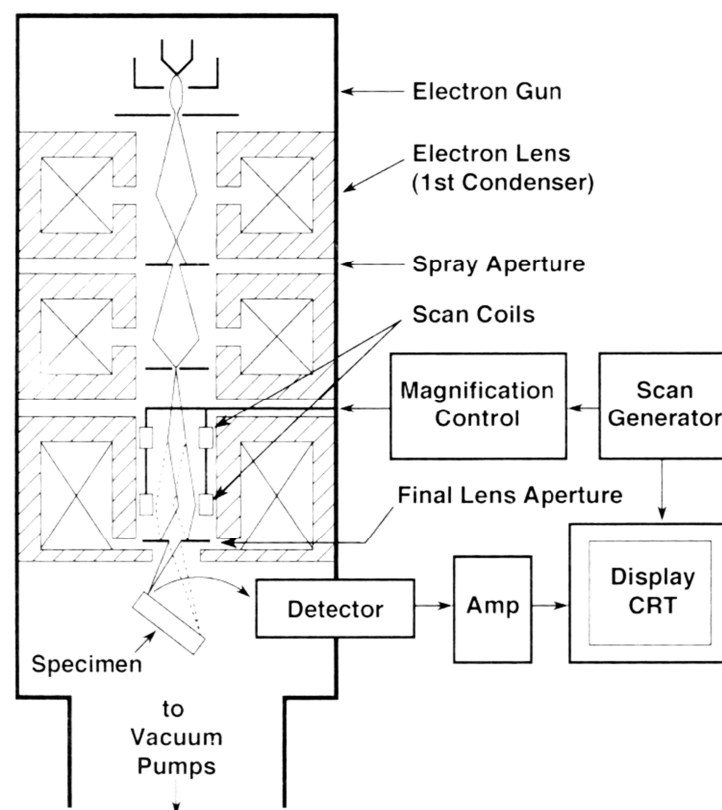


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Elektronensäule, der Linsen, des Rastersystems und des Detektors eines REM (Goldstein et al. 2002) .

Die von der Kathode freigesetzten Elektronen werden innerhalb der Elektronensäule mittels einer Hochspannung von einigen Kilovolt beschleunigt und mit elektrostatischen oder magnetischen Linsen fokussiert. Dieser fokussierte Strahl beleuchtet dann Punkt für Punkt in einer rasternden Bewegung einen Teil der Probenoberfläche (Goldstein et al. 2002).

Die Wechselwirkung der eingestrahlten Elektronen mit der Probe führt zu einer Anzahl verschiedener Signale mit unterschiedlichen Informationsgehalten. Eine Übersicht dazu gibt

Abbildung 10. An dieser Stelle soll nur auf die in dieser Arbeit verwendeten Signalarten näher eingegangen werden.

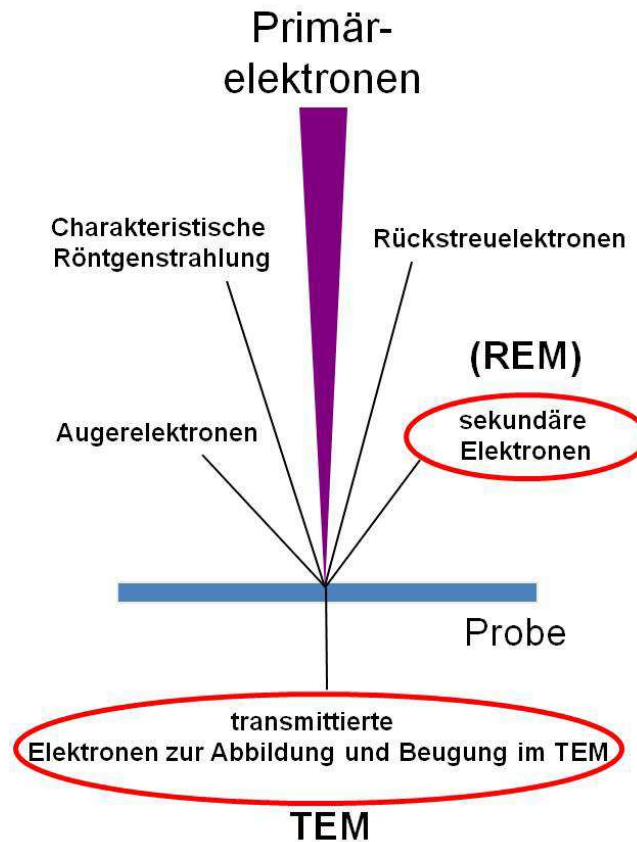


Abbildung 10: Übersicht über die im REM durch Elektron-Materie-Wechselwirkung entstehenden Signale

Die erste Art von Elektronen, die im REM zur Bilderzeugung genutzt werden, sind die Sekundärelektronen. Darunter versteht man langsame Elektronen ($E_{\text{kin}} \approx 50 \text{ eV}$), die aus den Atomen der Probe durch Wechselwirkung mit Primärstrahlelektronen ausgelöst werden. Sie stammen aus einer geringen Tiefe von wenigen Nanometern und zeigen vor allem Topographiekontraste, können aber auch qualitative Informationen über chemische Zusammensetzung und Leitfähigkeit geben. Moderne Geräte erzielen eine laterale Auflösung im Subnanometerbereich (Goldstein et al. 2002).

Vorversuche

Da an den Proben zuvor die Härtemessung durchgeführt und die Oberfläche mit Siliziumcarbid-Nassschleifpapier (Buehler GmbH Düsseldorf, Deutschland) der Körnung 4000 poliert wurde, war die Oberfläche sehr glatt. Wie sich in den Vorversuchen zeigte, war eine Strukturanalyse bei polierter Oberfläche erschwert, da die Struktur nicht ausreichend visualisiert werden konnte. Strukturcharakteristika konnten folglich nicht aufgelöst werden. In einer ersten Versuchsreihe wurde daher erprobt, welche Oberflächenpolitur zu einer guten Visualisierung der Dentinstruktur führte und daher besser zur Strukturanalyse geeignet war. Zu diesem Zweck wurden die polierten Proben mit solchen verglichen, die zuvor mit Nassschleifpapier der Körnung 1200 leicht aufgeraut worden waren. Abbildung 11 a) und b) sind repräsentative Darstellungen. Deutlich ist zu erkennen, dass leicht aufgeraute Oberflächen die Struktur des Dentins besser erkennen lassen.

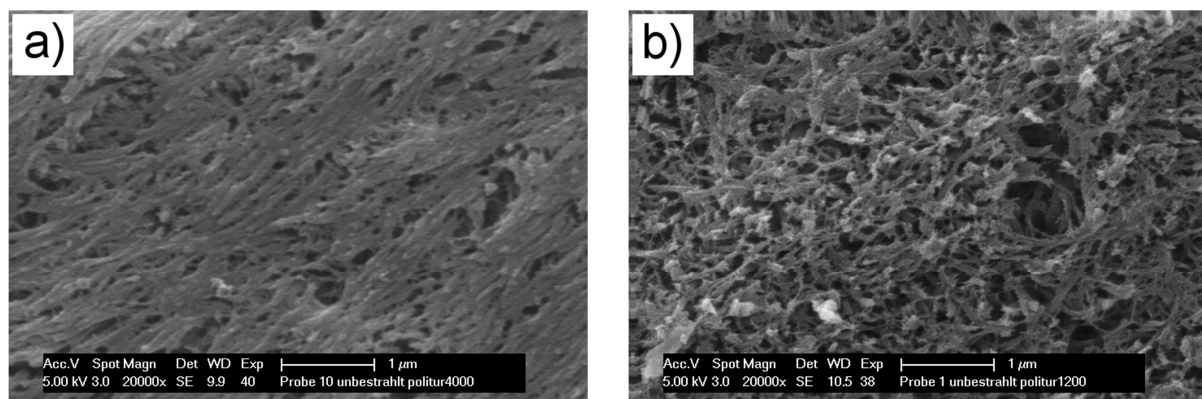


Abbildung 11: REM-Aufnahme des Dentins in 20.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind eine Probe, die mit „4000er“ Körnung poliert wurde (a), sowie eine Probe, die mit „1200er“ Körnung angeraut wurde (b).

Wie sich weiterhin zeigte, führte eine Bedampfung der Proben mit einer Standardkohlenstoffbeschichtung, wie sie in vergleichbaren Fällen angewendet wird, für diese Proben zu einer verfälschten Darstellung der Struktur. Eine Bedampfung mit Platin führte zu einer signifikanten Steigerung der Abbildungsverhältnisse. Einen Vergleich zwischen kohlenstoff- und platinbesputterten Proben zeigen Abbildung 12 a) und b). Eine Platinbeschichtung führt zu einer Situation, die die Struktur mit den wesentlichen charakteristischen Merkmalen erkennen lässt. Folglich wurde in der vorliegenden Studie eine Platinbeschichtung gewählt.

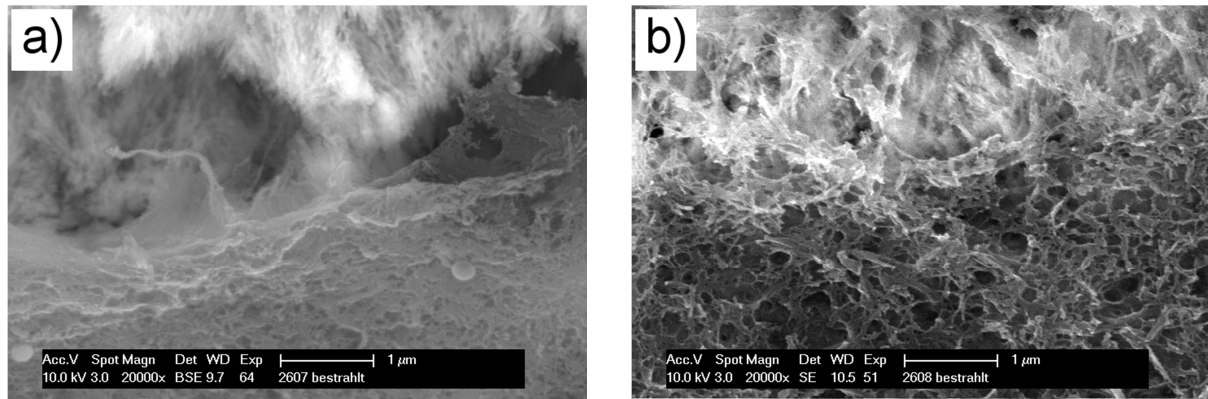


Abbildung 12: REM- Aufnahme der Schmelz-Dentin-Grenze in 20.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind eine mit Kohlenstoff besputterte Probe (a) sowie eine mit Platin besputterte Probe (b).

Die Vorversuche führten daher zu folgender Vorschrift für die Probenvorbereitung zur Strukturanalyse im REM:

Alle Proben wurden zunächst für 30 Sekunden auf einem mit Wasserkühlung betriebenen Poliermotor mit Nassschleifpapier der Körnung 1200 aufgeraut. Anschließend wurden alle Proben mit 0,5 M EDTA für 30 min bei Raumtemperatur oberflächlich entkalkt. Diese Vorbereitung der Proben ermöglichte eine sehr gute Darstellung der Dentinstruktur. Im Anschluss wurden die Proben jeweils für 2 mal 10 Minuten in einer Mikrotiterplatte mit destilliertem Wasser gewaschen. Im Anschluss folgte nachstehende Alkoholtrockenreihe:

- 1 x 10 min 30%igem Ethanol (reinst)
- 2 x 10 min 50%igem Ethanol (reinst)
- 2 x 10 min 70%igem Ethanol (reinst)
- 2 x 10 min 80%igem Ethanol (reinst)
- 2 x 10 min 90%igem Ethanol (reinst)
- 1 x 10 min als Übergang wurde der letzte 90%ige Alkohol nur halb abgesaugt und mit 100%igem Alkohol aufgefüllt
- 3 x 15 min 100%igem Ethanol (reinst)

Dabei wurde präzise darauf geachtet, dass die Präparate zwischen den einzelnen Schritten nie austrockneten. Um die Proben möglichst schonend zu trocknen, wurden sie dann für 30 Minuten in HDMS (1,1,1,3,3,3 - Hexamethyldisilazan, 98 %, ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gelegt. Im Anschluss wurden die Proben unter den Abzug gestellt, um das HDMS verdunsten zu lassen.

Die so vorbereiteten Proben wurden mithilfe eines leitfähigen Kohle-Metallbandes auf den REM-Probetellern befestigt. Um Aufladungseffekte in den zu untersuchenden Dentinbereichen zu vermeiden, wurden zur besseren Ladungsableitung kleine Brücken leitfähigen Metallbandes bis ins Dentin gelegt (Abbildung 13).

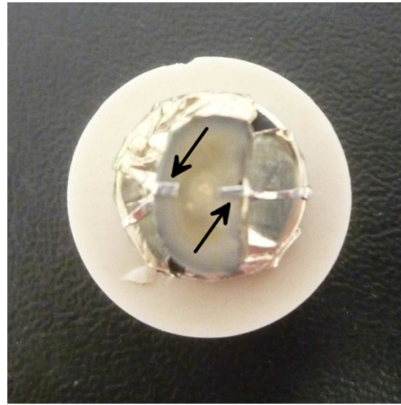


Abbildung 13: Photographie einer mit leitfähigem Kohle-Metallband auf dem Probeteller fixierten Zahnprobe. Zur weiteren Verbesserung der Leitfähigkeit wurden kleinen Brücken des Metallbandes (→) bis ins Dentin gelegt.

Abschließend wurden die Proben, ebenfalls zwecks Vermeidung von Aufladungserscheinungen während der Analyse im REM, mit Platin bedampft. (Polaron, Sputter coater, 0,8 kV, 15 mA).

Hauptversuche

Ziel der Hauptversuche war die systematische Untersuchung möglicher Effekte einer γ -Strahlenbelastung auf die kollagene Netzwerkstruktur des Dentins. Hierzu wurden mit verschiedenen Strahlungsdosen bestrahlte und entsprechend unbestrahlte Zähne desselben Patienten verglichen. Alle Proben wurden entsprechend der Vorschrift, die in den Vorversuchen ermittelt wurde, vorbereitet und anschließend am Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht.

Da für die Vorversuche bereits einige Proben benötigt wurden und weitere Proben in einer parallel durchgeführten Arbeit (Hackethal 2013) verwendet wurden, lagen folgende Zähne mit entsprechender Strahlenbelastung vor:

Tabelle 2: Anzahl der in dieser Arbeit am REM untersuchten Zähne in den verschiedenen Bestrahlungsgruppen

Strahlendosis [Gy]	Anzahl der Zähne
2	2
5	6
10	6
20	6
60	6

Bei der Analyse der Struktur lag der Fokus dieser Studie auf der Analyse von γ -Strahlungseffekten auf das Dentin. Die Schmelz-Dentin-Grenze war nur in seltenen Fällen intakt. Meist war sowohl bei den bestrahlten als auch bei den unbestrahlten Proben, bedingt durch den Trocknungsvorgang, eine Rissbildung entlang der Schmelz-Dentin-Grenze zu beobachten. Die noch intakten, rissfreien Bereiche der Schmelz-Dentin-Grenze wurden dokumentiert.

Einstellungen des Rasterelektronenmikroskops (FEG ESEM, FEI XL 30, FEI-Company, Kassel, Deutschland):

Beschleunigungsspannung: 5.00 kV
Vergrößerung: 10.000x, 20.000x, 40.000x
Signal: SE

b) Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine hochauflösende Mikroskopietechnik, bei der dünne Proben (Dicke in der Größenordnung um 100 nm und weniger) mit hochenergetischen Elektronen durchstrahlt werden. Es wird demnach in Transmission gearbeitet. Durch die vielfältigen Wechselwirkungen der Elektronen mit der Probe lässt sich ein breites Spektrum chemischer und struktureller Informationen gewinnen. Dabei gibt es zwei grundlegende Betriebsarten: Abbildung und Beugung. In der vorliegenden Arbeit wurde das Transmissionselektronenmikroskop ausschließlich im Abbildungsmodus verwendet. Gegenüber der Rasterelektronenmikroskopie wird hierbei die höhere örtliche Auflösung ausgenutzt. Methodisch bedingt werden Strukturen im Querschnitt betrachtet.

Zusätzlich zu den Informationen der Rasterelektronenmikroskopie, welche die Oberfläche beschreiben, können nun auch strukturelle Querschnittsanalysen hinsichtlich der Strukturen unternommen werden (Williams et al. 1996).

Vorbereitung der Proben

Für die Untersuchungen im TEM wurden, wie bereits in Kapitel 3.1.4 beschrieben, die aus einem 0,5 mm dicken Dentinscheibchen hergestellten Dentinblättchen verwendet.

Da wir uns zunächst sowohl für entkalktes Dentin, in dem die Kollagenfasern frei liegen, als auch für das unentkalkte Dentin interessierten, wurden die Scheibchen 24 Std. in 0,5M EDTA anentkalkt, fünfmal für 10 Minuten in PBS- Puffer gewaschen und bis zum nächsten Tag in mit PBS gefüllten Rollrandgläsern im Kühlschrank gelagert. Bereits unter dem Lichtmikroskop waren nun eine entkalkte Randzone sowie ein unentkalkter Kern sichtbar.

So vorbereitet wurden die Proben zunächst mit Osmium kontrastiert:

- 1 g Osmium wurde in 50 ml Phosphatpuffer pH 7,4 über Nacht aufgelöst.
- Der Puffer wurde abpipettiert und die Rollrandgläsern mit der Osmiumlösung aufgefüllt, bis die Proben gut bedeckt waren.
- Inkubationszeit: 2 Stunden bei Raumtemperatur
- Die Osmiumlösung wurde wieder abpipettiert.
- Die Proben wurden 5 mal 10 Minuten mit PBS gespült.
- Weitere 10 Minuten wurden sie mit destilliertem Wasser gespült.
- Zum Abschluss wurden die Proben in 50%igem Alkohol über Nacht im Kühlschrank bei 8° C gelagert

Zur Entwässerung der Proben folgte dann eine Alkoholtrockenreihe:

- 1 x 10 min 50%igem Ethanol (reinst)
- 2 x 10 min 70%igem Ethanol (reinst)
- 2 x 10 min 90%igem Ethanol (reinst)
- 1 x 10 min 100%igem Ethanol (reinst)
- 2 x 20 min 100%igem Ethanol (reinst) mit geschlossenem Deckel
- 2 x 20 min Propylenoxid unter dem Abzug mit geschlossenem Deckel

Hierbei wurde, wie bereits bei der Vorbereitung der Proben für das REM, genauestens darauf geachtet, dass die Präparate zwischen den einzelnen Schritten nicht austrockneten.

Damit eine optimale Probenpräparation im Mikrotom möglich war und um die Probe währenddessen zu schützen, wurde jeder Zahn in Araldit eingebettet. Dieser Prozessschritt erstreckte sich über drei Tage.

1. Tag der Araldit- Einbettung:

Das Aralditgemisch wurde wie folgt hergestellt:

- 26 g Araldit wurden mit 24 g DDSA (2 – Dodecenyl – Succinicanhydrid) mit einem langsam drehenden Glasflügelrührer unter dem Abzug 40 min gemischt.
- Es wurden 3 % Beschleuniger (Dy – 064) (1,5 g) zugegeben und weitere 15 min gerührt.
- Anschließend wurden 51,5 ml Propylenoxid zugegeben und für weitere 20 min gerührt.

Das Gemisch wurde nun auf neue Rollrandgläschen verteilt und die Dentinscheibchen wurden vorsichtig hineingelegt. Zusätzlich wurde ein beschrifteter Zettel zur Identifikation mit jeder Probe eingebettet.

Über Nacht wurden nun die offenen Rollrandgläschen unter dem Abzug gelagert. So konnte das Propylenoxid verdunsten.

2. Tag der Araldit-Einbettung:

Das Aralditgemisch wurde nun in einer geänderten Zusammensetzung wie folgt hergestellt:

- 52 g Araldit wurden mit 48 g DDSA (2 – Dodecenyl – Succinicanhydrid) mit einem langsam drehenden Glasflügelrührer unter dem Abzug 60 min gemischt.
- Es wurden 2 % Beschleuniger (Dy – 064) (2 g) zugegeben und weitere 15 min gerührt.

Das Gemisch wurde nun auf neue Rollrandgläschen verteilt, und die Dentinscheibchen wurden vorsichtig in die neuen Gefäße überführt.

3.Tag der Araldit- Einbettung:

Das Aralditgemisch wurde wieder in einer geänderten Zusammensetzung wie folgt hergestellt:

- 10,4 g Araldit wurden mit 9,6 g DDSA (2 – Dodecenyl – Succinicanhydrid) mit einem langsam drehenden Glasflügelrührer unter dem Abzug 30 min gemischt.
- Es wurden 2 % Beschleuniger (Dy – 064) (0,4 g) zugegeben und weitere 15 min gerührt.

Die Einbettformen wurden nun blasenfrei zur Hälfte mit dem Aralditgemisch aufgefüllt. Die Präparate wurden vorsichtig überführt. Die richtige Position der Präparate wurde unter dem Auflichtmikroskop kontrolliert.

Dann wurden die Vertiefungen der Einbettformen leicht überhöht mit Araldit aufgefüllt und 2 Tage bei 65° C zum Auspolymerisieren im Brutschrank gelagert.

In den nächsten Schritten wurden die Proben für das Anfertigen der Ultradünnschnitte mit dem Ultramikrotom vorbereitet.

- Die eingebetteten Proben wurden mit Nassschleifpapier der Körnung 1200 getrimmt, bis sowohl entkalktes als auch unentkalktes Dentin an dem Anschliff vorlag. Anschließend wurde die Schliffstelle hochglanzpoliert („4000er“ Schleifpapier).
- Nun wurde der Bereich für die Ultradünnschnitte ausgewählt, und die Ränder wurden von allen Seiten beigetrimmt („1200er“ Schleifpapier).
- Als letzter Schritt wurde dieser Bereich mit einer Skalpellklinge zurechtgetrimmt. Dabei stellte sich das Schneiden des unentkalkten Dentins als wesentlich schwieriger heraus.

Nun wurden am Ultramikrotom mithilfe einer Diamantklinge 150 bis 90 nm dicke Ultradünnschnitte der Proben angefertigt. Diese Ultradünnschnitte wurden anschließend auf Kupfernetzen als letzter Schritt der Vorbereitung kontrastiert.

Die Kontrastierung erfolgte mit Bleicitrat und Uranylacetal:

- Uranylacetatlösung (0,1 g Uranylacetat in 1 ml 70%igem Methanol in einem Eppendorf Cap) wurde gut geschüttelt und für 15 min bei 15000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in Tüpfelplattenvertiefungen gefüllt und die Kupfernetze mit der Präparatseite nach unten vorsichtig daraufgelegt.
- Nun wurden die Proben nacheinander in vier, mit destilliertem Wasser gefüllten Tüpfelplattenvertiefungen je fünfmal vertikal zum Spülen eingetaucht und anschließend vorsichtig mit Filterpapier getrocknet.

- Die Bleicitratl sung wurde jetzt ebenfalls für 15 min bei 15000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung in großen Tropfen auf eine mit Wachs ausgegossene Petrischale gegeben. Auch hier wurden die Netze mit der Pr paratseite nach unten für fünf Minuten vorsichtig auf die Tropfen gelegt.
- Es folgte erneut eine wie oben beschriebene Spülung mit destilliertem Wasser.
- Abschließend wurden die Proben zum Trocknen und bis zur weiteren Verwendung in einer Netzbox gelagert.

Hauptversuche

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie sollten die bestrahlten Proben vor allem auf strukturelle Unterschiede im Vergleich zu den unbestrahlten Referenzproben untersucht werden. Folgende Zähne wurden am Transmissionselektronenmikroskop in den entsprechenden Bestrahlungsgruppen untersucht:

Tabelle 3: Anzahl der in dieser Arbeit am TEM untersuchten Zähne in den verschiedenen Bestrahlungsgruppen

Strahlendosis [Gy]	Anzahl der Zähne
5	4
20	4
60	4

Damit lagen sowohl Proben mit geringer Strahlendosis als auch Proben mit hoher Strahlendosis vor. Somit konnte ein eventueller Maximaleffekt der Bestrahlung auf die kollagene Struktur studiert werden.

Einstellungen des Transmissionselektronenmikroskops (Tecnai 12, Biotwin, FEI-Company, Kassel, Deutschland):

Beschleunigungsspannung: 100 kV

Vergrößerungen: 16.500x, 43.000x, 87.000x

Signal: Abbildungsmodus

4 Ergebnisse

4.1 Mikrohärtemessung

Der Mikrohärteverlauf für jeden Zahn wurde an acht Stellen bestimmt. Drei Messpunkte lagen im Schmelz, wobei sich der dritte Messpunkt unmittelbar an der Schmelz-Dentin-Grenze befand (Abbildung 14). Drei weitere Messstellen wurden im Dentin unmittelbar an der Schmelz-Dentin- Grenze gewählt. Zwei weitere Werte wurden im zentralen Dentin bestimmt (Abschnitt 3.2.1.2).

Die Mikrohärteverläufe von bestrahlten und unbestrahlten Zähnen eines Patienten wurden direkt miteinander verglichen. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden alle bestrahlten Zähne zusammen mit dem unbestrahlten Partnerzahn einer thermischen Wechselbelastung mit 10.000 Zyklen unterzogen.

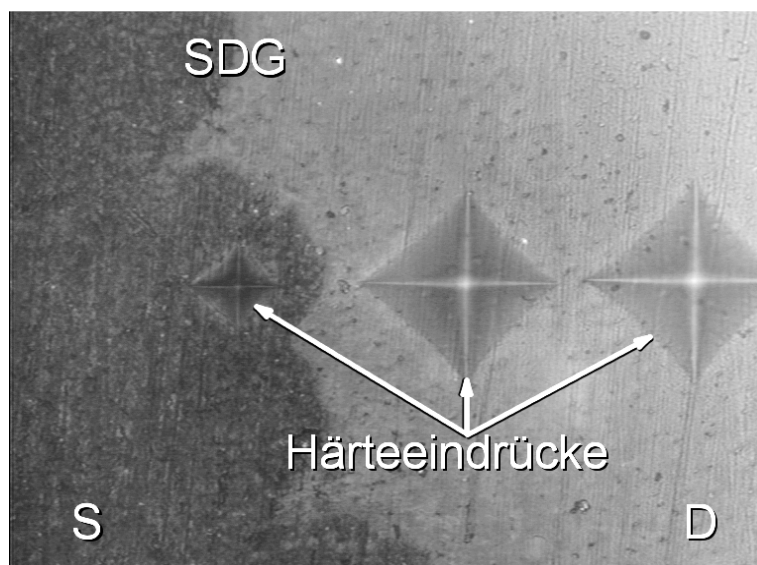


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Darstellung (Vergrößerung: 40fach) der polierten Zahnprobe im Schmelz- Dentin-Grenzbereich (SDG). Zu sehen sind Prüfabbrücke nach der Vickersmethode bei einer Prüfkraft von 981,2 mN sowohl im Schmelz (S) als auch im Dentin (D). Die Pyramidengrundfläche wurde lichtmikroskopisch vermessen und diente zur Berechnung der Härtewerte.

Insgesamt wurden jeweils sieben Zahnpaare der Bestrahlungsgruppen 10, 20 und 60 Gy in Hinblick auf die Mikrohärte untersucht.

In den Abbildungen 15 bis 17 sind jeweils repräsentativ die Ergebnisse des Mikrohärteverlaufes von 2 Zahnpaaren je Bestrahlungsgruppe abgebildet. Die Messpunkte 1 bis 3 liegen jeweils im Schmelz mit zunehmender Nähe zum Dentin. Die Punkte 4 bis 6 liegen im Dentin unmittelbar hinter der Schmelz-Dentin-Grenze. Die Punkte 7 und 8 liegen ebenfalls im Dentin mit zunehmendem Abstand von der Schmelz-Dentin-Grenze.

Wie zu erwarten, sieht man einen Härteabfall vom Schmelz über die Schmelz-Dentin-Grenze bis ins Dentin. Innerhalb des Dentins zeigte sich ein leichter Härteanstieg bis ins zentrale Dentin. Vergleicht man den Härteverlauf im Dentin eines bestrahlten Zahnes mit seinem unbestrahlten Partnerzahn, so lassen sich bei keinem der Paare signifikante Unterschiede feststellen. Auffällig waren hingegen die Unterschiede der Schmelzhärte besonders im äußeren Schmelzbereich. Unter Berücksichtigung aller Paare ließ sich diese nicht als systematische Abweichung feststellen, da je nach Messung entweder der unbestrahlte oder bestrahlte Schmelzbereich härter war (Abbildung 15 a und b).

Die Ergebnisse der Mikrohärtemessung zeigen zusammengefasst, dass eine radiologische Bestrahlung im gewählten Dosisbereich zu keiner Änderung in den Härteverläufen vom Schmelz bis in das zentrale Dentin führt.

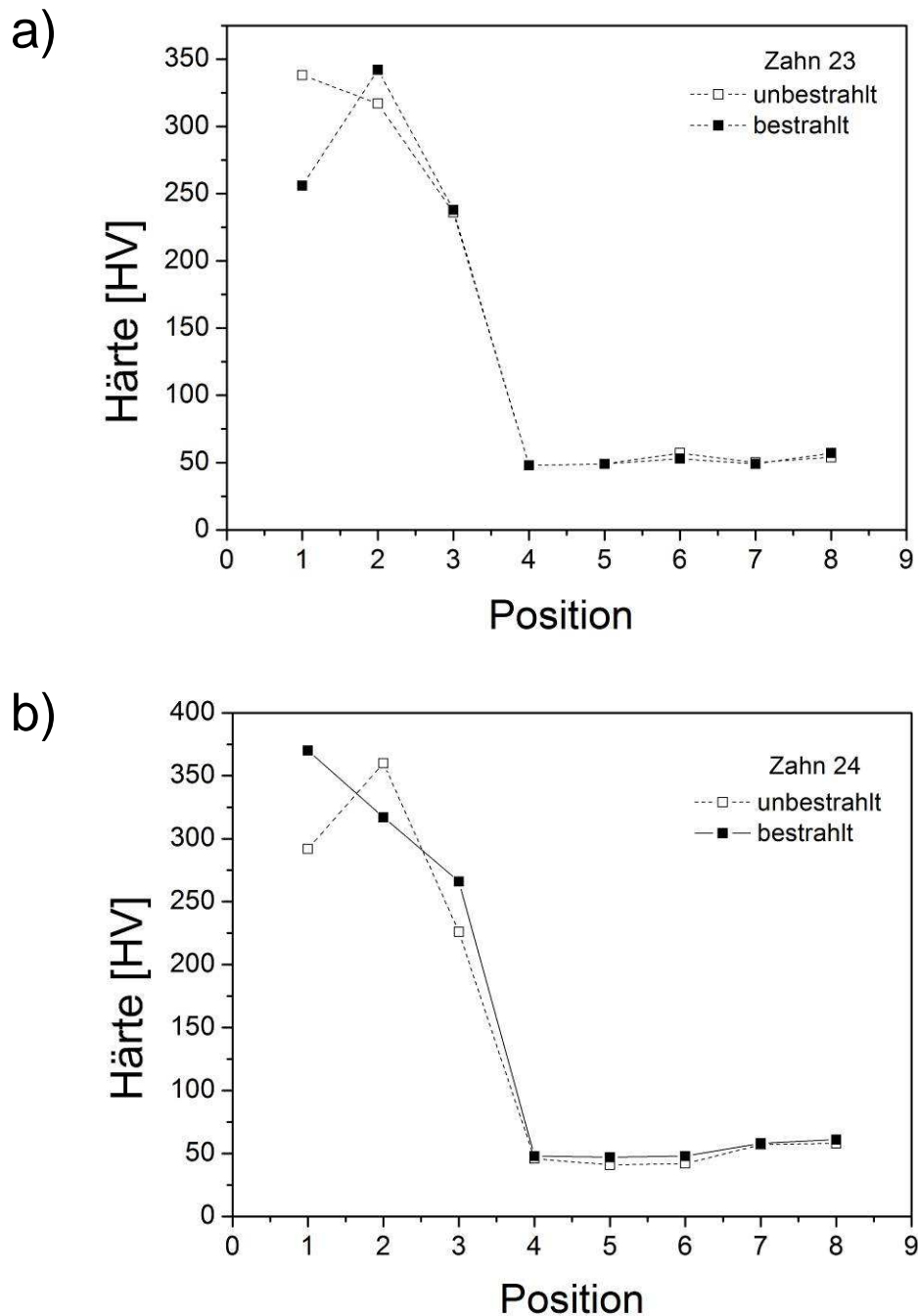


Abbildung 15: Darstellung des Härteverlaufes zweier Zahnpaare (a und b) jeweils bestrahlt mit 10 Gy und unbestrahlt. Die Messpunkte 1 bis 3 liegen jeweils im Schmelz mit zunehmender Nähe zum Dentin. Die Punkte 4 bis 6 liegen im Dentin unmittelbar hinter der Schmelz-Dentin-Grenze. Die Punkte 7 und 8 liegen ebenfalls im Dentin mit zunehmendem Abstand von der Schmelz-Dentin-Grenze.

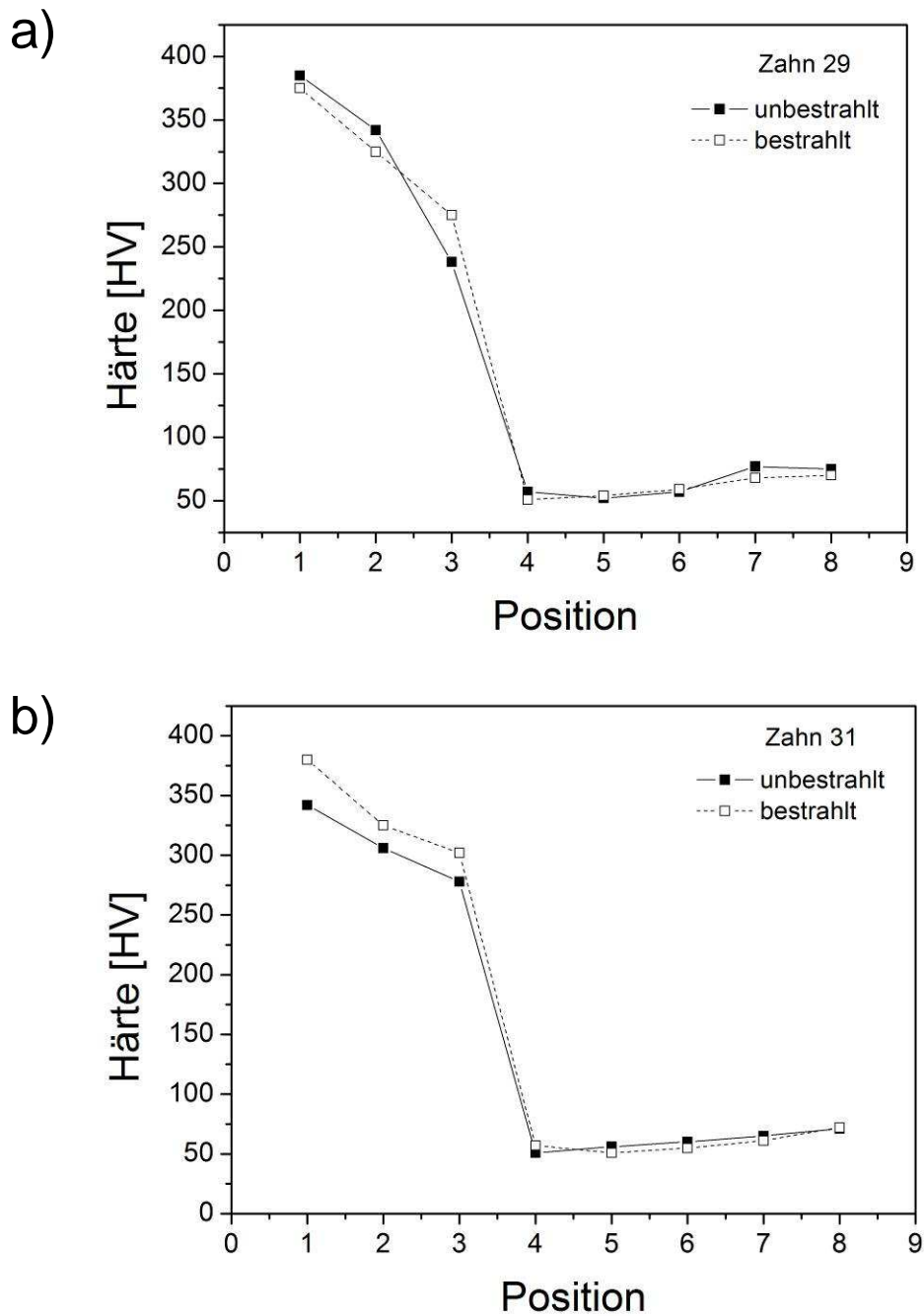


Abbildung 16: Darstellung des Härteverlaufes zweier Zahnpaare (a und b) jeweils bestrahlt mit 20 Gy und unbestrahlt. Die Messpunkte 1 bis 3 liegen jeweils im Schmelz mit zunehmender Nähe zum Dentin. Die Punkte 4 bis 6 liegen im Dentin unmittelbar hinter der Schmelz-Dentin-Grenze. Die Punkte 7 und 8 liegen ebenfalls im Dentin mit zunehmendem Abstand von der Schmelz-Dentin-Grenze.

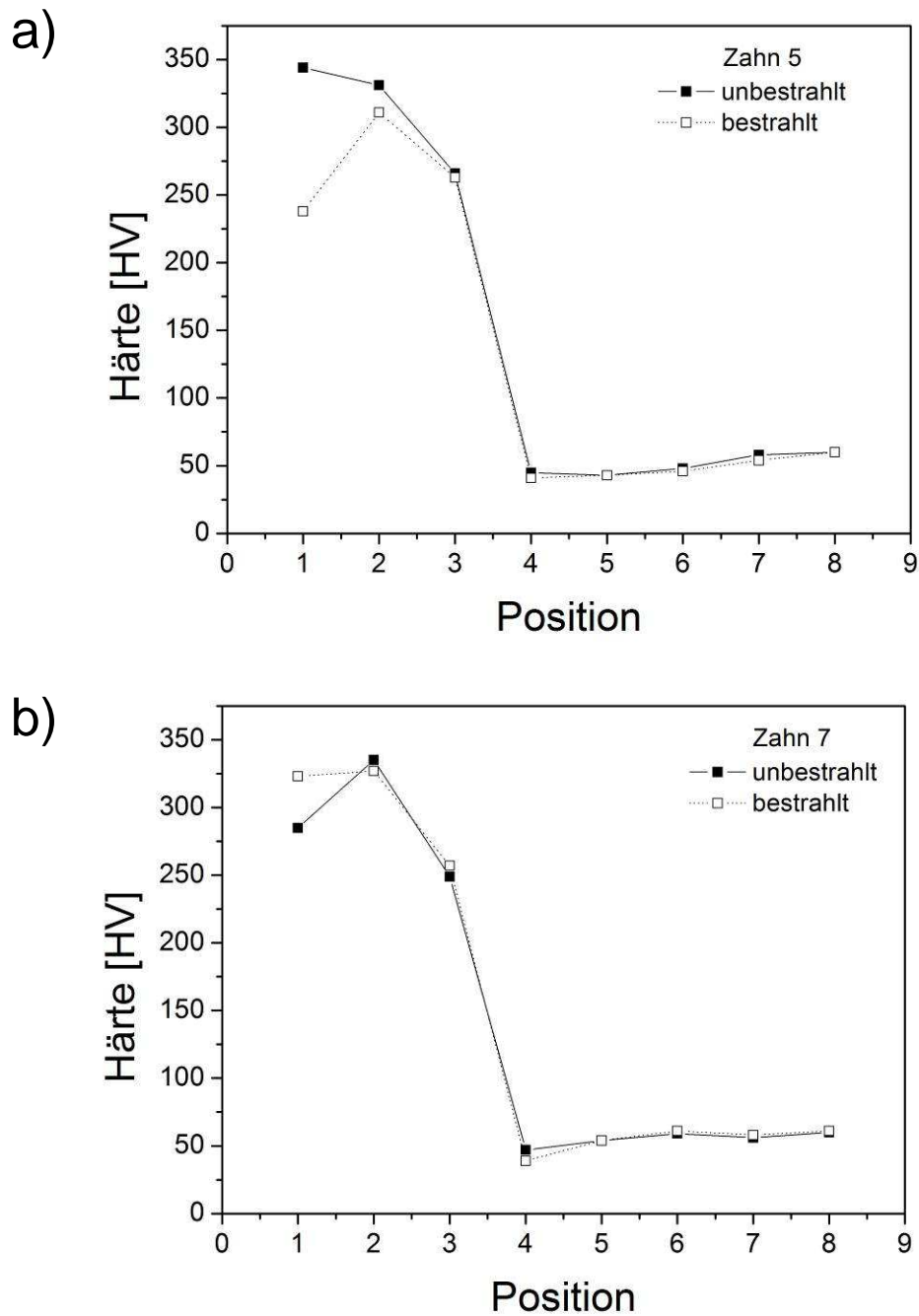
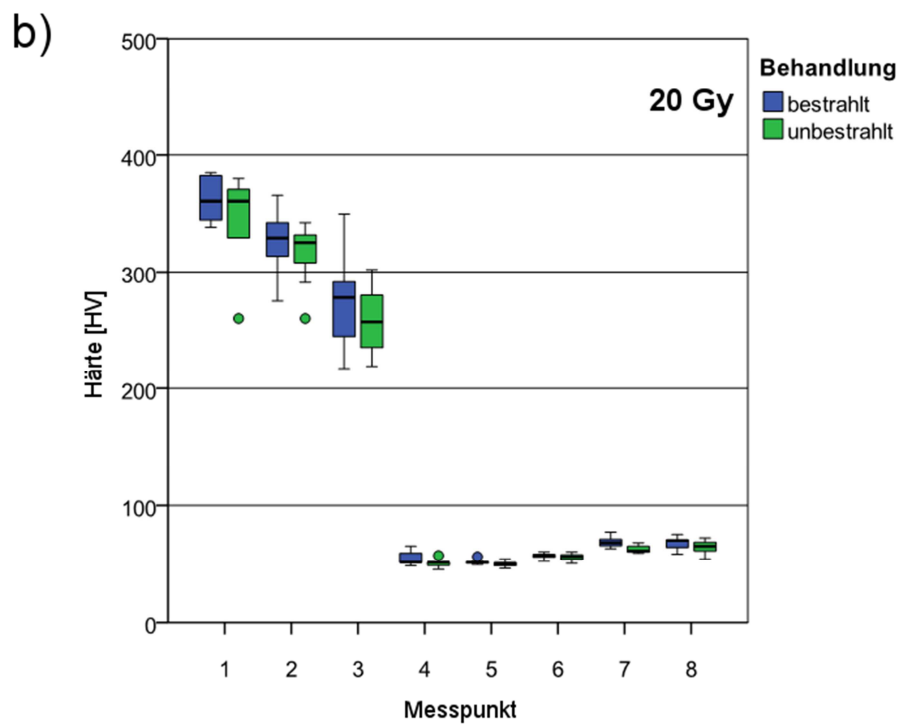
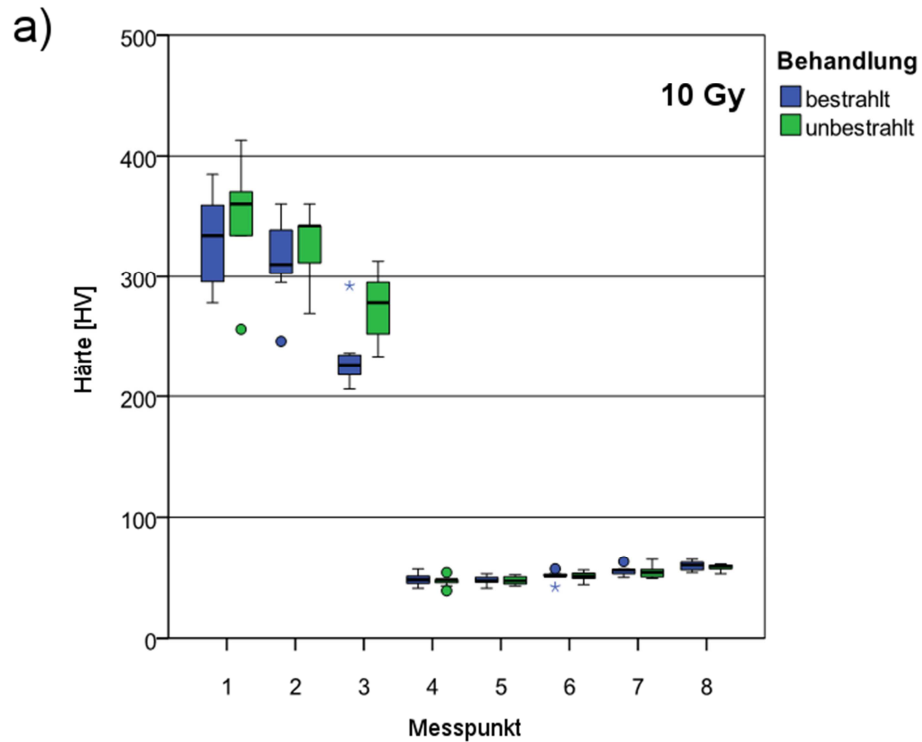


Abbildung 17: Darstellung des Härteverlaufes zweier Zahnpaare (a und b) jeweils bestrahlt mit 60 Gy und unbestrahlt. Die Messpunkte 1 bis 3 liegen jeweils im Schmelz mit zunehmender Nähe zum Dentin. Die Punkte 4 bis 6 liegen im Dentin unmittelbar hinter der Schmelz-Dentin-Grenze. Die Punkte 7 und 8 liegen ebenfalls im Dentin mit zunehmendem Abstand von der Schmelz-Dentin-Grenze.

4.1.1 Statistische Analyse

Abbildungen 18 a-c zeigen den Vergleich aller Härtemessungen dargestellt in Boxplot-Diagrammen.



Legende siehe nächste Seite

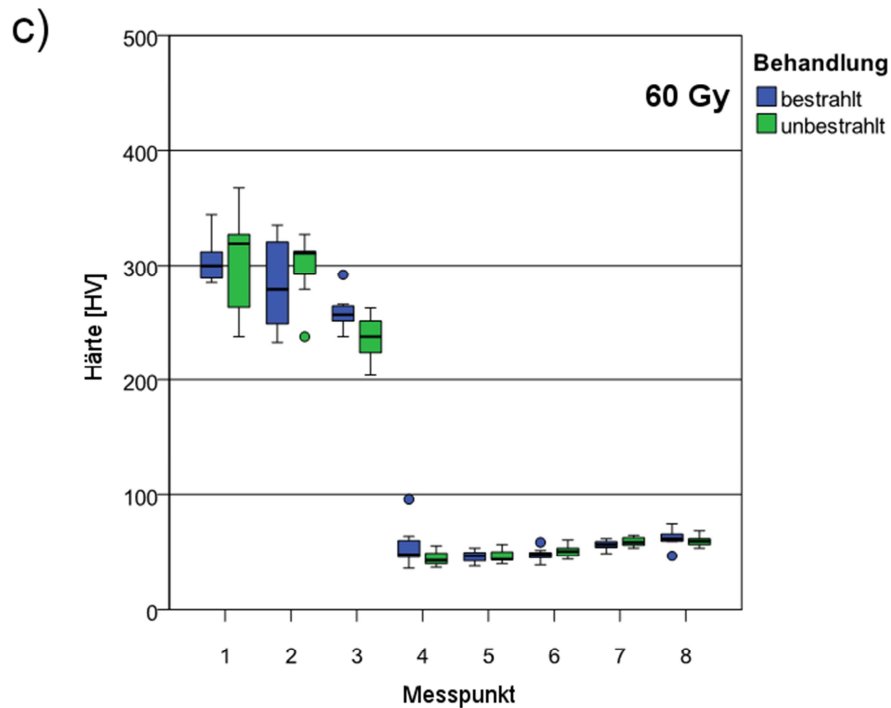
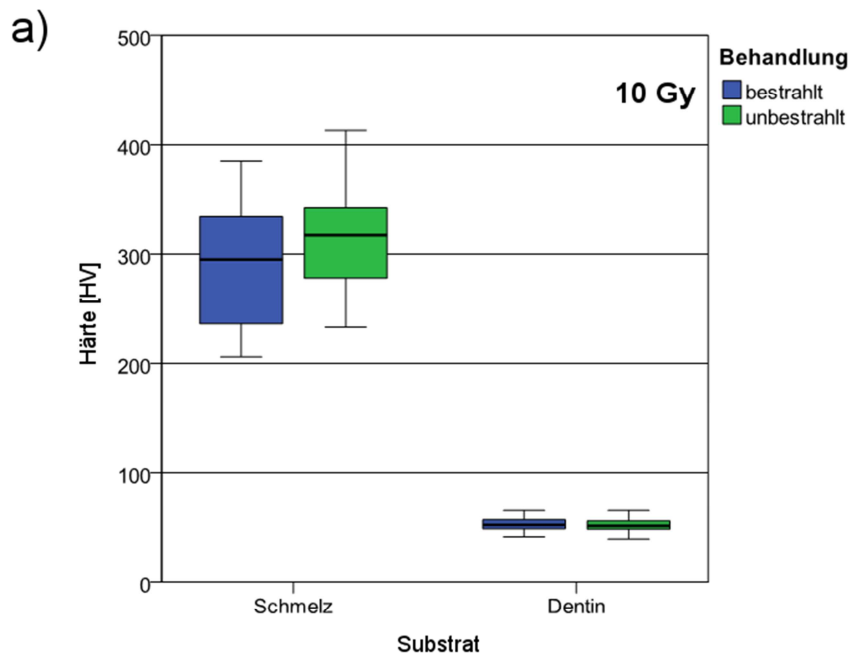


Abbildung 18: Vergleich der einzelnen Härtewerte der Bestrahlungsgruppen a) 10 Gy, b) 20 Gy und c) 60 Gy in einem Boxplot-Diagramm für den unbestrahlten (grün) und bestrahlten (blau) Fall.

Wie in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben, wurden anschließend die Messwerte für Schmelz und Dentin gepoolt und mit der unbestrahlten Referenz verglichen (Abbildung 19 a-c).



Legende siehe nächste Seite

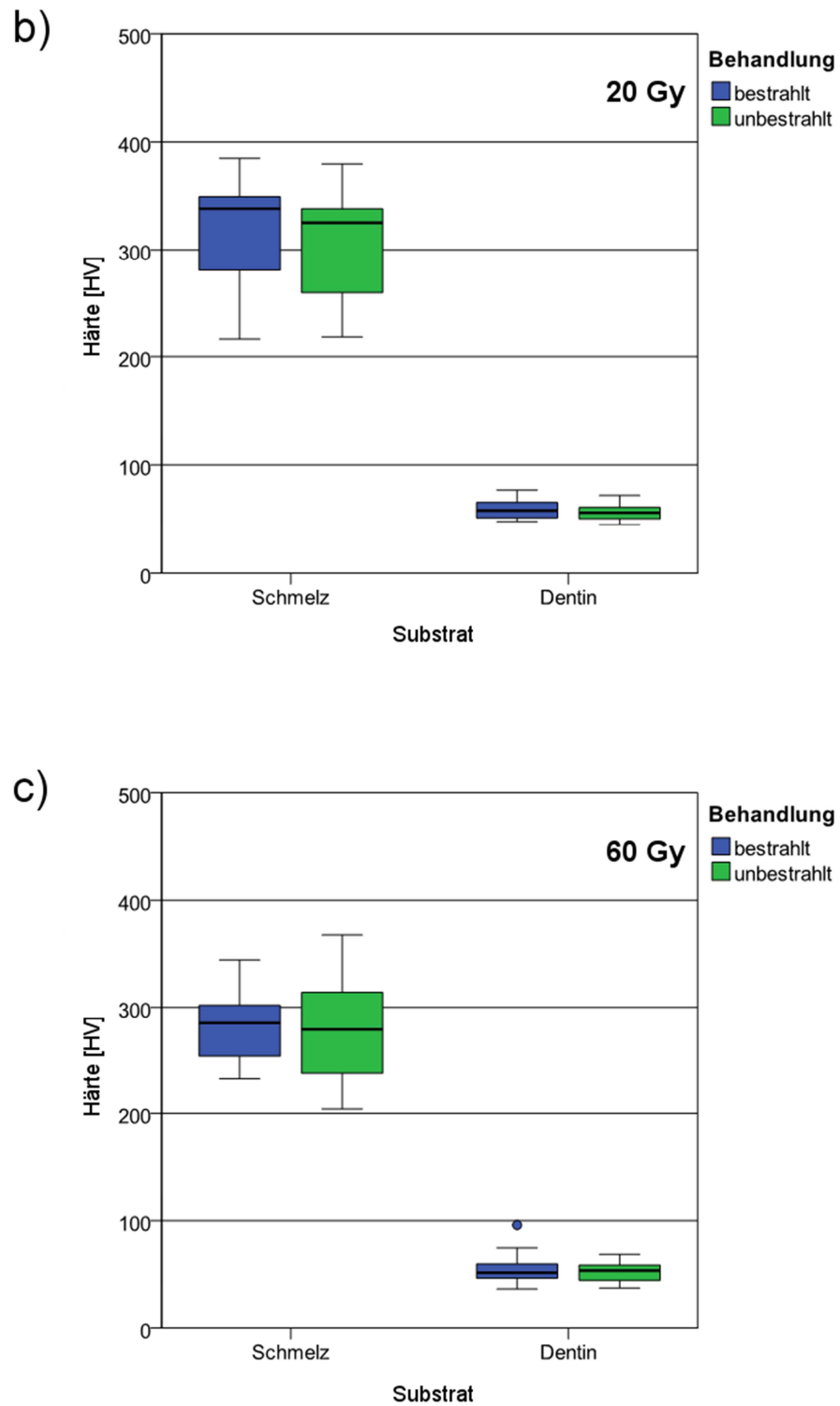


Abbildung 19: Vergleich der Härtewerte der Bestrahlungsgruppen a) 10 Gy, b) 20 Gy und c) 60 Gy in einem Boxplot-Diagramm für den unbestrahlten (grün) und bestrahlten (blau) Fall. Die Daten für Schmelz bzw. Dentin sind gepoolt dargestellt.

Außerdem wurde ein T-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Die Ergebnisse hinsichtlich der Signifikanz sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Signifikanzen der Differenzen zwischen bestrahltem und unbestrahltem Zahn. Der grau markierte Bereich zeigt einen signifikanten Unterschied, da das Signifikanzniveau auf 0,05 festgelegt wurde.

Dosis	Bereich	Signifikanz in der Differenz zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zähnen
10 Gy	Schmelz	0,121
	Dentin	0,610
20 Gy	Schmelz	0,360
	Dentin	0,007
60 Gy	Schmelz	0,714
	Dentin	0,603

Anzumerken ist, dass eine signifikante Abweichung in den Härtewerten nur in der Bestrahlungsgruppe 20 Gy im Dentin zu beobachten ist (siehe grau markierte Zeile).

4.2 Strukturanalyse

Wie in Abschnitt 2.2 ausgeführt, wird vermutet, dass eine Veränderung des Kollagennetzwerks infolge einer radiologischen Bestrahlung die Ursache für die beschriebenen strahlenkariösen Befunde ist. Ziel der vorliegenden Strukturanalyse war daher die systematische Untersuchung von radiologischen Strahlungseffekten auf das kollagene Netzwerk im Dentin (vgl. Fragestellung 2).

Zu diesem Zweck wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie sowie Transmissionselektronenmikroskopie die Kollagenstruktur des Dentins im bestrahlten und unbestrahlten Zustand verglichen. Die Rasterelektronenmikroskopie erlaubt dabei eine detaillierte Beschreibung des dreidimensionalen Netzwerkes mit dem interfibrillären Zwischenraum. Eine exakte Erfassung der Struktur der einzelnen Fibrillen sowie deren Aufzweigungen ist mit rasterelektronischen Methoden nur begrenzt möglich. Die Methode der Wahl ist hierfür die Transmissionselektronenmikroskopie. Methodisch bedingt ist hierbei die großflächige dreidimensionale Beschreibung des Netzwerkes nicht möglich. Beide Methoden erlauben damit in ihrer Kombination eine möglichst detailreiche Beschreibung des Kollagennetzwerkes.

Nach der Bestrahlung wurden alle Zahnpaare einer thermischen Wechselbelastung unterzogen, welche eine biologische Alterung von einem Jahr simuliert (Abschnitt 3.1.3). Bei den folgenden Versuchen wurde stets ein bestrahlter Zahn mit seinem unbestrahlten Partnerzahn desselben Patienten verglichen.

4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurde bei diesen Versuchen die Struktur des Dentinkollagens zweier Zähne desselben Patienten im bestrahlten und unbestrahlten Zustand verglichen. Die rasterelektronenmikroskopische Analyse fand an entkalkten Proben statt (Abschnitt 3.2.2). Hierdurch war es möglich, die anorganische Matrix herauszulösen und somit das freiliegende Kollagennetzwerk zu beurteilen. Mögliche Effekte auf das dentine Kollagen konnten so optimal von Effekten auf die Matrix getrennt werden.

Die Versuchsreihen wurden in fünf Bestrahlungsgruppen von 2 bis 60 Gy eingeteilt. In der 2-Gy-Bestrahlungsgruppe wurde ein Zahnpaar, in allen anderen Bestrahlungsgruppen (5, 10, 20 und 60 Gy) wurden jeweils 3 Zahnpaare untersucht. Übersichts- sowie Detailaufnahmen in 10.000-, 20.000- und 40.000facher Vergrößerung wurden sowohl im Bereich des zentralen Dentins als auch im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze aufgenommen.

In einzelnen Fällen war es nicht möglich, die intakte Schmelz-Dentin-Grenze abzubilden, da es präparationsbedingt zu Rissbildung entlang der Schmelz-Dentin-Grenze kam. Davon waren im gleichen Maße bestrahlte und unbestrahlte Zähne betroffen. Da der Fokus der Arbeit jedoch auf der strukturellen Analyse des bestrahlten Dentins lag, wurde von einer aufwendigeren Präparation zum Erhalt der Schmelz-Dentin-Grenze abgesehen.

a) Struktureller Vergleich im zentralen Kronendentin

Repräsentativ für alle untersuchten Zahnpaare wird im Folgenden der Effekt der γ -Strahlen auf das zentrale Kronendentin an einem Zahnpaar pro Bestrahlungsgruppe dargestellt. Zu diesem Zweck wurde eine einheitliche Vergrößerung von 40.000fach gewählt. Vergleiche mit niedrigeren Vergrößerungen zeigten, dass diese Vergrößerung die strukturellen Merkmale am besten auflöst.

Abbildung 20 bis 24 zeigen aufsteigend nach der applizierten Strahlungsdosis das zentrale Dentin jeweils im unbestrahlten und bestrahlten Zustand. Die Abbildungen zeigen sowohl im unbestrahlten als auch im bestrahlten Fall kollagene Fibrillen, die ein filigranes Netzwerk bilden. Bedingt durch die entkalkende Probenpräparation wurde die anorganische Matrix entfernt. Folglich liegt das Kollagen Netzwerk frei.

Das kollagene Netzwerk wird unter anderem durch folgende morphologische Parameter charakterisiert (Hashimoto et al 2003):

- Länge der Kollagenfibrillen
- Aufzweigungen der Kollagenfibrillen
- Interfibrillärer Zwischenraum

Beim Vergleich des Netzwerks der unbestrahlten Proben hinsichtlich dieser Parameter zeigten sich inter-individuelle Unterschiede. So erscheint beispielsweise der interfibrilläre Zwischenraum in Abbildung 21a weniger stark ausgeprägt als in Abbildung 22a. Hinsichtlich der Länge der Fibrillen wirkt diese in Abbildung 23a länger als in Abbildung 24a.

Am Beispiel eines möglichen Unterschieds im interfibrillären Zwischenraum sei dies anhand von Tabelle 5 erläutert. Mit steigender Bestrahlungsdosis von 2 bis 60 Gy ist diesbezüglich keine systematische Veränderung festzustellen.

Ein Maximaleffekt auf strukturelle Änderungen wäre bei Proben zu erwarten, die mit der Maximaldosis von 60 Gy bestrahlt wurden. Gerade der Vergleich in dieser Bestrahlungsgruppe zeigt aber keine signifikante Variation im Kollagen Netzwerk (Tabelle 5).

Diese Beobachtung stützt folglich die These, dass keine systematischen Änderungen der kollagenen Struktur durch Bestrahlung auftraten.

Tabelle 5: Vergleich des interfibrillären Zwischenraums des unbestrahlten Zahnes mit dem bestrahlten Partnerzahn in den unterschiedlichen Bestrahlungsgruppen.

Strahlungsgruppe [Gy]	Tendenzielle Entwicklung des interfibrillären Zwischenraums unbestrahlt - bestrahlt	Abbildung
2	geringer	20
5	geringer	21
10	gleichbleibend	22
20	steigend	23
60	gleichbleibend	24

Zusammengefasst zeigte die rasterelektronenmikroskopische Analyse, dass durch die Bestrahlung im gewählten Dosisbereich die Struktur des Kollagennetzwerks keine systematischen Veränderungen aufweist.

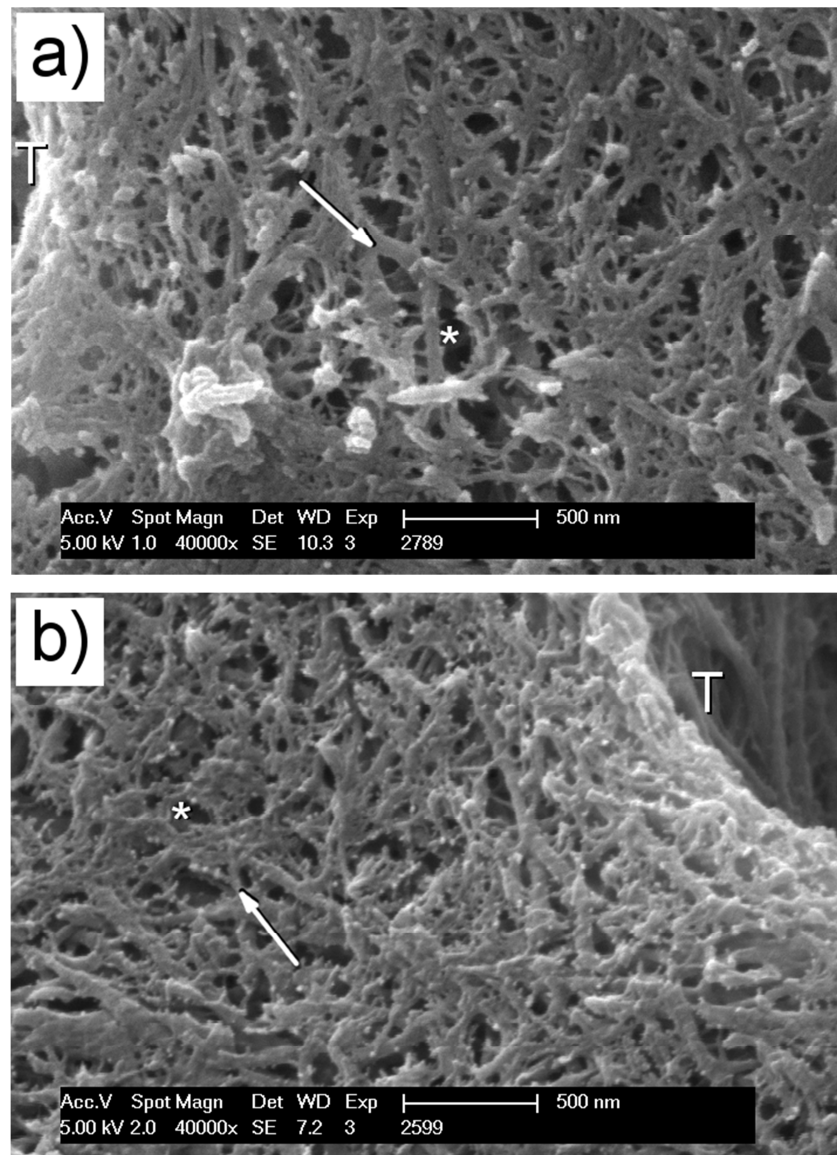


Abbildung 20: REM-Aufnahme des zentralen Dentins einer unbestrahlten (a) und einer mit 2 Gy bestrahlten (b) Probe bei 40.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind der Rand eines Tubulus (T) sowie das individuelle Kollagennetzwerk mit sich verzweigenden Kollagenfibrillen (→) und interfibrillären Zwischenräumen (*).

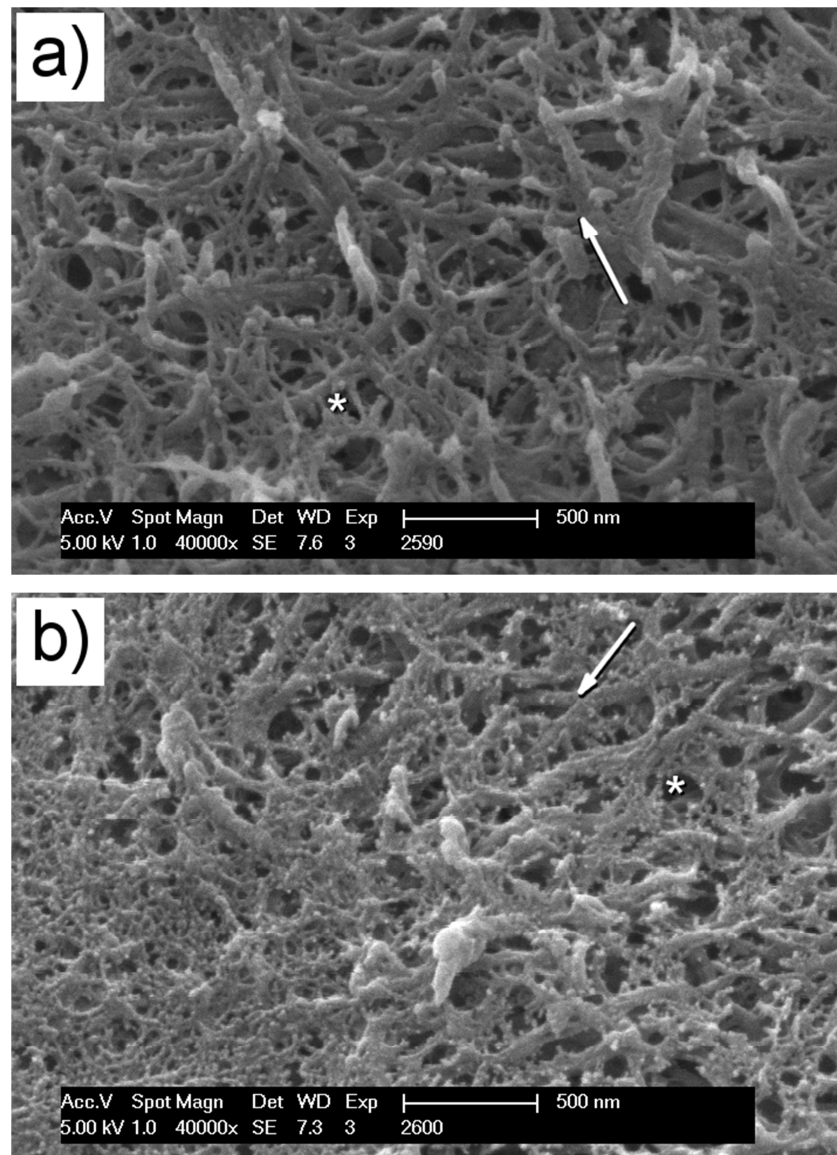


Abbildung 21: REM-Aufnahme des zentralen Dentins einer unbestrahlten (a) und einer mit 5 Gy bestrahlten (b) Probe bei 40.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind der Rand eines Tubulus (T) sowie das individuelle Kollagennetzwerk mit sich verzweigenden Kollagenfibrillen (→) und interfibrillären Zwischenräumen (*).

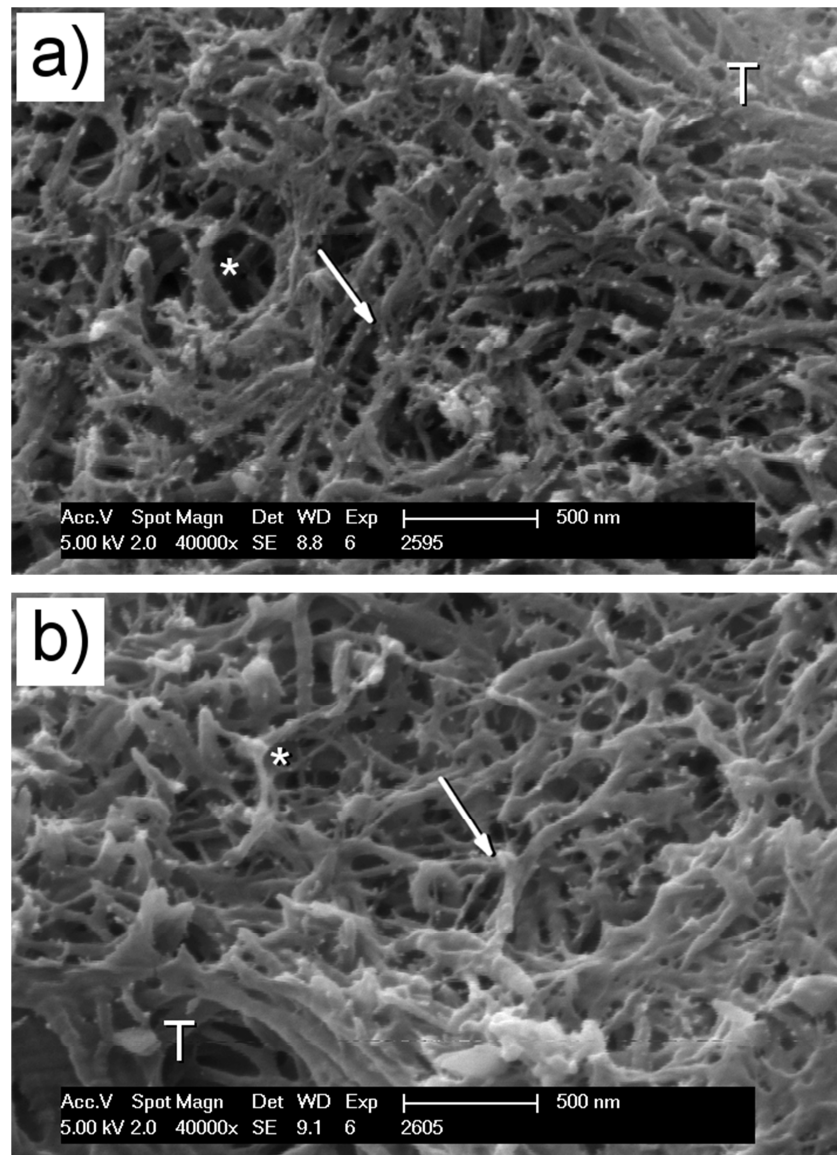


Abbildung 22: REM-Aufnahme des zentralen Dentins einer unbestrahlten (a) und einer mit 10 Gy bestrahlten (b) Probe bei 40.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind der Rand eines Tubulus (T) sowie das individuelle Kollagennetzwerk mit sich verzweigenden Kollagenfibrillen (→) und interfibrillären Zwischenräumen (*).

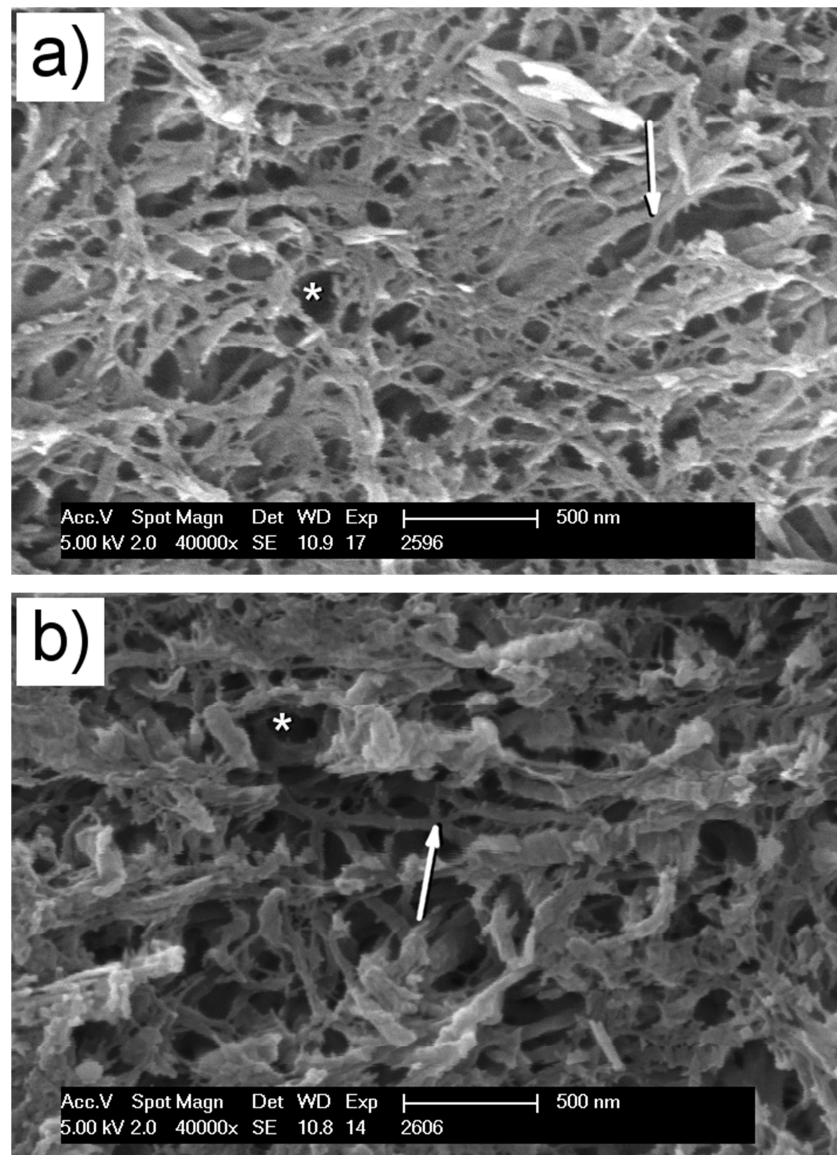


Abbildung 23: REM- Aufnahme des zentralen Dentins einer unbestrahlten (a) und einer mit 20 Gy bestrahlten (b) Probe bei 40.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind der Rand eines Tubulus (T) sowie das individuelle Kollagen Netzwerk mit sich verzweigenden Kollagenfibrillen (→) und interfibrillären Zwischenräumen (*).

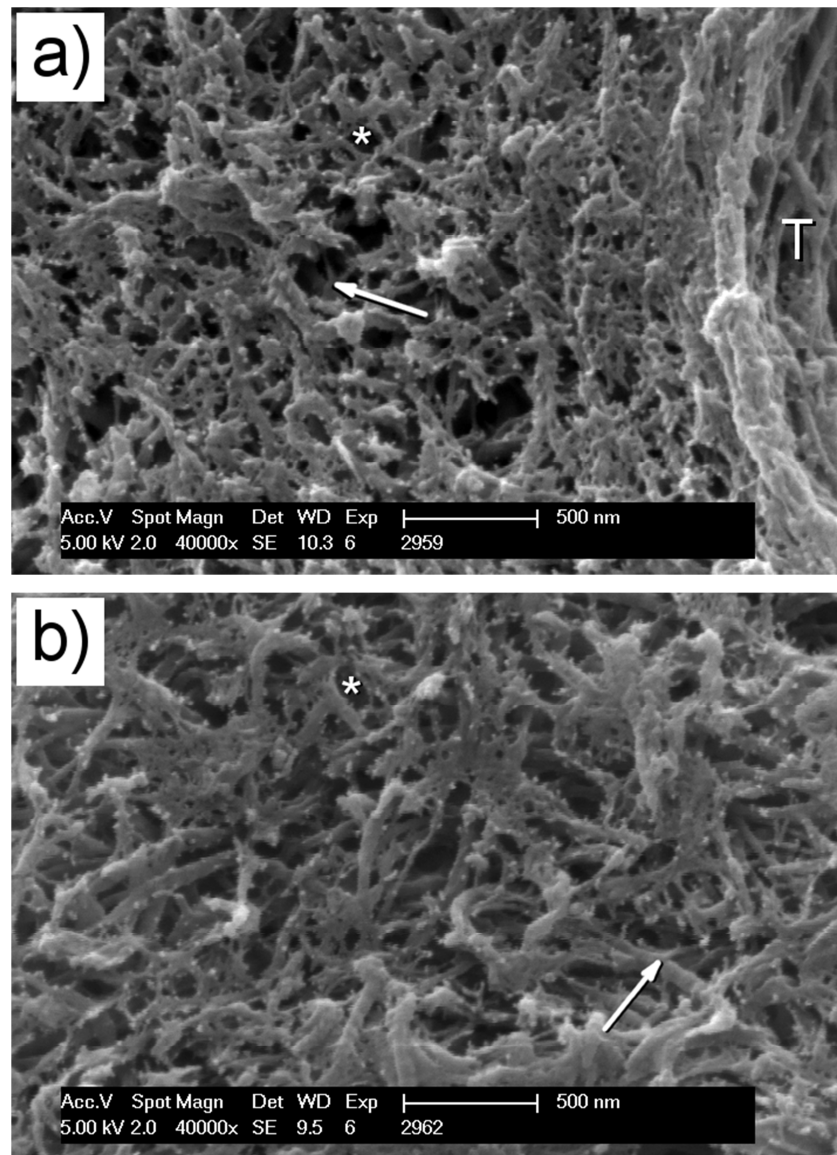


Abbildung 24: REM- Aufnahme des zentralen Dentins einer unbestrahlten (a) und einer mit 60 Gy bestrahlten (b) Probe bei 40.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind der Rand eines Tubulus (T) sowie das individuelle Kollagennetzwerk mit sich verzweigenden Kollagenfibrillen (→) und interfibrillären Zwischenräumen (*).

b) Struktureller Vergleich an der Schmelz-Dentin-Grenze

Repräsentativ für alle untersuchten Zahnpaare wird im Folgenden der Maximaleffekt der radiologischen Bestrahlung im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze an zwei Zahnpaaren analysiert. Hierzu werden Proben einer niedrigen Bestrahlungsgruppe (5 Gy) sowie der höchsten Bestrahlungsgruppe (60 Gy) verwendet. Übersichtsaufnahmen mit 10.000facher Vergrößerung, die eine großflächige Analyse des Bereichs um die Schmelz-Dentin-Grenze zulassen, sind in Abbildung 25 und 27 gezeigt. Für eine Detailanalyse wird zum Zwecke der Vergleichbarkeit die Vergrößerung wie in Abschnitt 4.2.1a) gewählt (40.000fach).

In den Übersichtsaufnahmen lässt sich der geschwungene Verlauf der Schmelz-Dentin-Grenze erkennen (Abbildung 25 und 27). Der Vergleich zwischen bestrahltem und unbestrahltem Zahn lässt in dieser Vergrößerung sowohl im Falle von 5 Gy als auch von 60 Gy keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Detailaufnahmen in 40.000facher Vergrößerung zeigen bei einer Bestrahlung mit 5 Gy einen vergrößerten interfibrillären Abstand (Abbildung 26). Das Kollagennetz scheint nach der Bestrahlung weitmaschiger. Das Kollagennetzwerk nach einer Bestrahlung mit 60 Gy scheint engmaschiger und die einzelnen Fibrillen kürzer (Abbildung 28). Folglich wird hier die gegenteilige Tendenz sichtbar. Somit lässt sich auch in diesem Fall keine systematische Veränderung der Kollagenstruktur des Dentins nach einer Bestrahlung nachweisen. Auch bei den hier nicht gezeigten Proben spiegelte sich dieses Bild wider. Wie bereits im zentralen Dentin zeigt sich auch an der Schmelz-Dentin-Grenze, dass eine Bestrahlung zu keinen systematischen morphologischen Veränderungen führt.

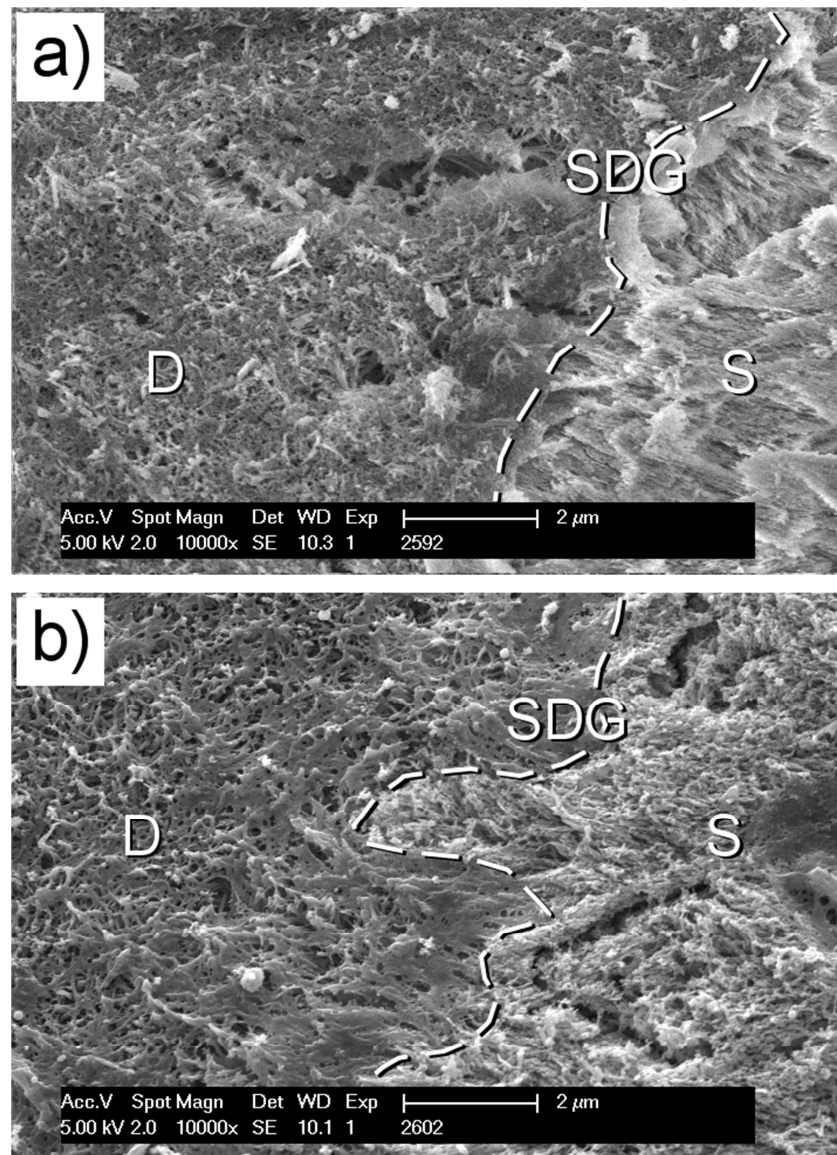


Abbildung 25: REM-Aufnahme der Schmelz-Dentin-Grenze (SDG) einer unbestrahlten (a) sowie einer mit 5 Gy bestrahlten (b) Probe bei 10.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind der Verlauf der Schmelz-Dentin-Grenze sowie grenznahe Dentin (D) und Schmelz (S).

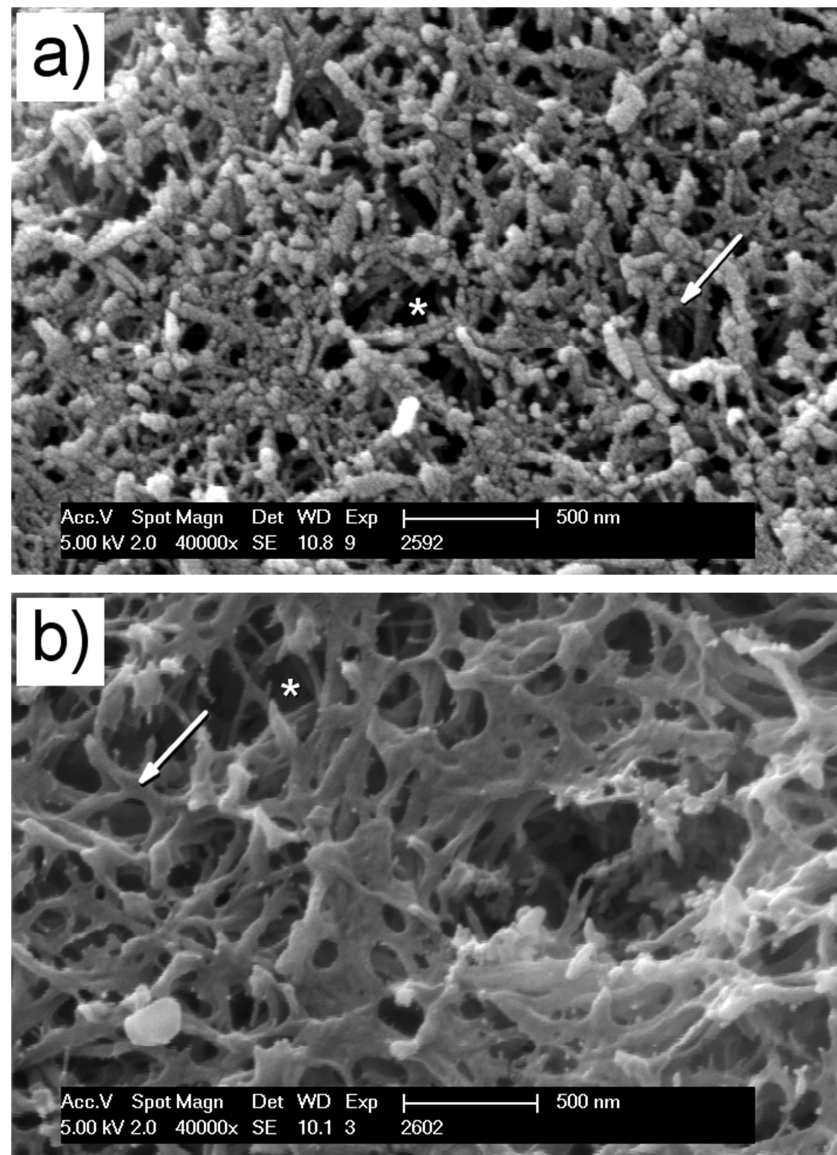


Abbildung 26: REM-Aufnahme des Dentins unmittelbar an der Schmelz-Dentin-Grenze einer unbestrahlten (a) und einer mit 5 Gy bestrahlten (b) Probe bei 40.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind das individuelle Kollagen Netzwerk mit sich verzweigenden Kollagenfibrillen (→) sowie interfibrilläre Zwischenräume (*).

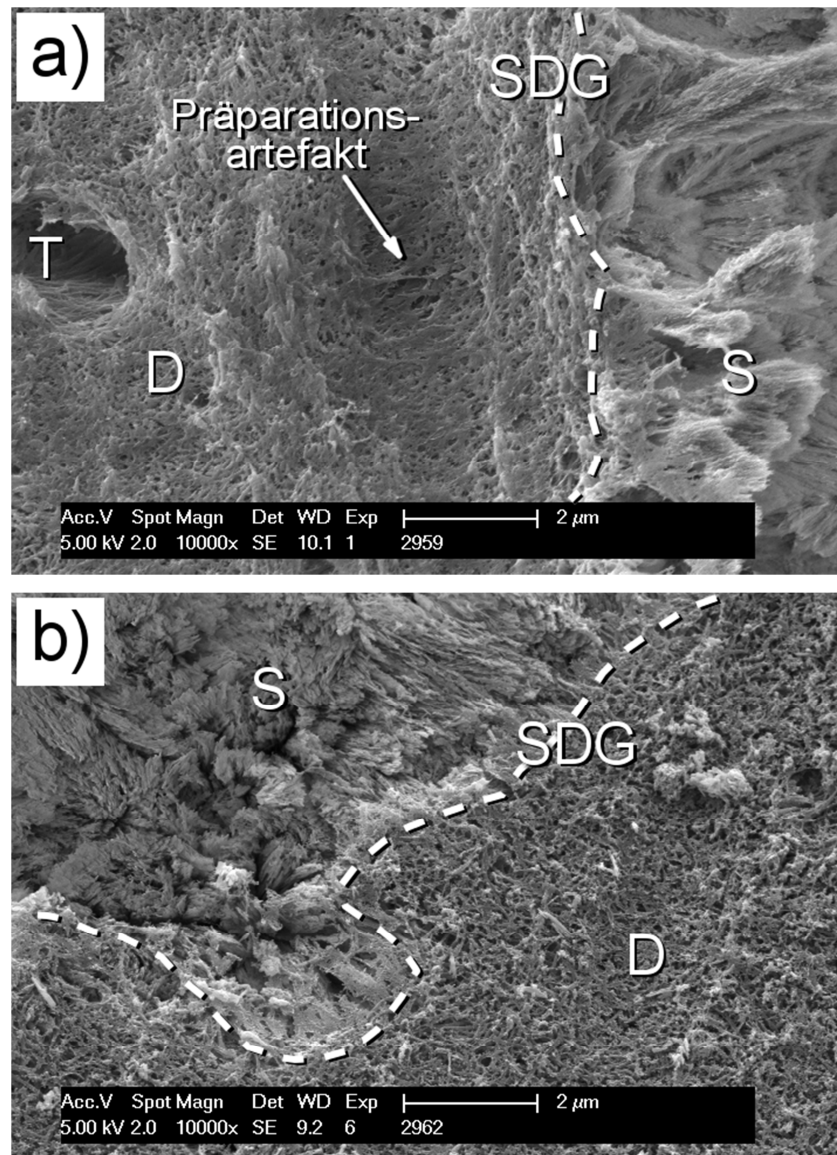


Abbildung 27: REM-Aufnahme der Schmelz-Dentin-Grenze (SDG) einer unbestrahlten (a) und einer mit 60 Gy bestrahlten (b) Probe bei 10.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind Schmelz (S), Dentin (D) und in a) ein Dentintubulus (T).

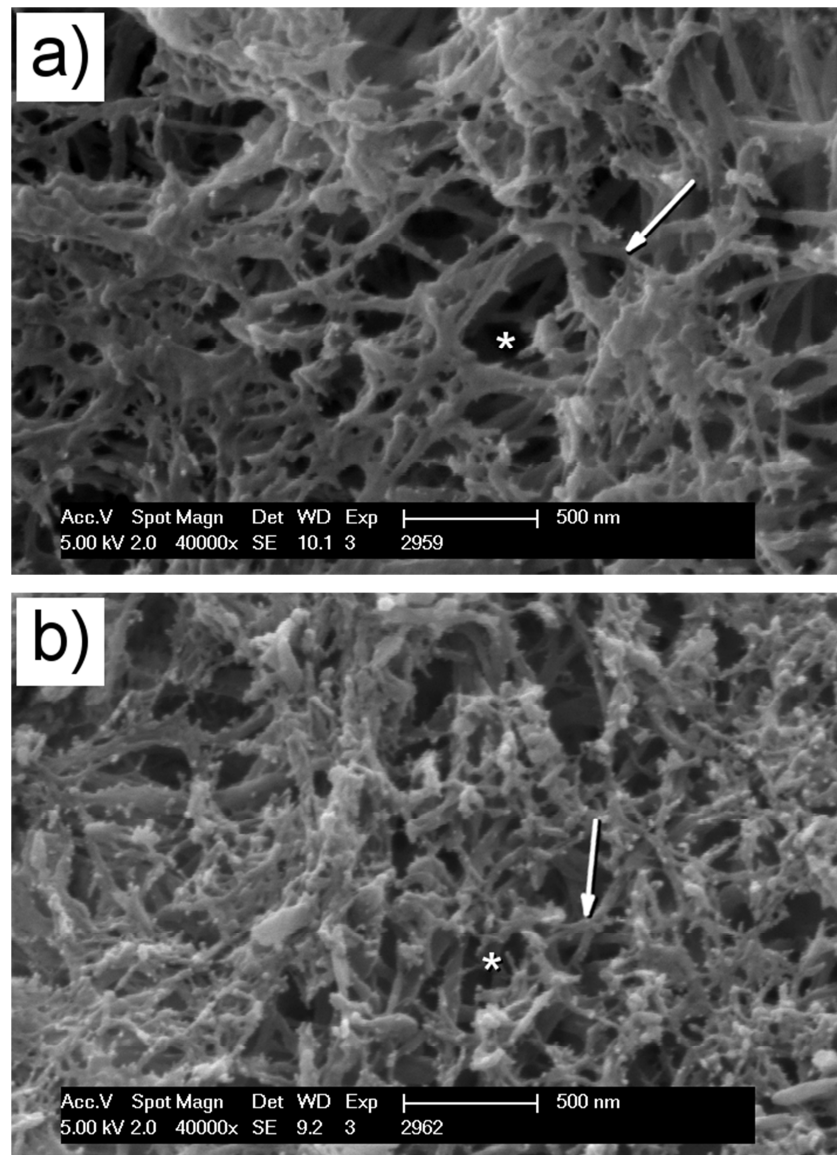


Abbildung 28: REM-Aufnahme des Dentins unmittelbar an der Schmelz-Dentin-Grenze einer unbestrahlten (a) und einer mit 60 Gy bestrahlten (b) Probe bei 40.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind das individuelle Kollagen Netzwerk mit sich verzweigenden Kollagenfibrillen (→) sowie interfibrilläre Zwischenräume (*).

4.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurde die Struktur des Kollagennetzwerks hinsichtlich der detaillierten Struktur der Fibrillen, deren charakteristischer Querstreifung sowie deren Aufzweigungen untersucht. Mögliche Strahlungseffekte auf die Substruktur des dreidimensionalen Kollagennetzwerks, d. h. auf die Struktur der einzelnen Fibrillen, konnte somit beurteilt werden.

Zwei Zähne desselben Patienten, von denen einer bestrahlt wurde, wurden im unentkalkten und entkalkten Bereich der Probe verglichen. Je zwei Zahnpaare der niedrigen (5 Gy), mittleren (20 Gy) und hohen (60 Gy) Bestrahlungsgruppen wurden untersucht. Vergrößerungen von 16.500-, 43.000- und 87.000fach wurden zur Analyse gewählt.

a) Vergleich entkalkt – unentkalkt

Abbildung 29 zeigt den entkalkten und den unentkalkten Bereich einer Probe, die mit 60 Gy bestrahlt wurde. Im entkalkten Bereich (Abbildung 29 a) sind eindeutig die kollagenen Fibrillen mit ihrer charakteristisch bandenartigen Struktur zu erkennen. Darüber hinaus lassen sich der interfibrilläre Zwischenraum sowie die Aufzweigungen beschreiben. Der Vergleich zum unentkalkten Bereich (Abbildung 29 b) zeigt, dass hier zusätzlich die nadelartigen kristallinen Strukturen des Apatits zu erkennen sind. Die beschriebenen Details im Kollagen sind jedoch nicht mehr so deutlich zu erkennen. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Charakterisierung der organischen Kollagenmatrix liegt, wurde in der transmissionselektronenmikroskopischen Strukturanalyse ausschließlich der entkalkte Bereich der Proben betrachtet.

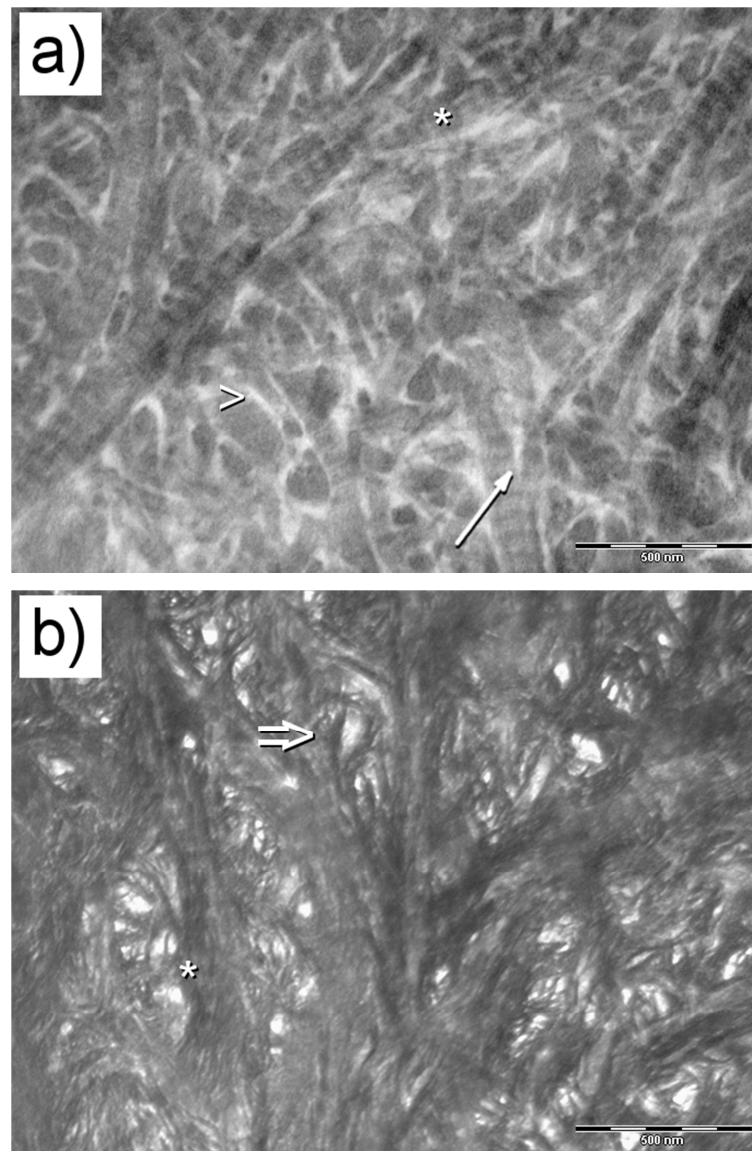


Abbildung 29: TEM-Aufnahme des entkalkten (a) sowie des unentkalkten (b) Dentins bei 43.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind die typische Querstreifung (*) des Kollagens sowie in a) Aufzweigungen in Myofibrillen(→) und der interfibrilläre Zwischenraum (>). In b) erkennt man die nadelartige Struktur der Apatitkristalle (⇒).

b) Struktureller Vergleich im zentralen Kronendentin

Repräsentativ für alle untersuchten Zahnpaare wird im Folgenden der Effekt der γ -Strahlen auf das zentrale Kronendentin an einem Zahnpaar pro Bestrahlungsgruppe dargestellt. Zu diesem Zweck wurde eine einheitliche Vergrößerung von 43.000fach gewählt.

Abbildung 30 bis 32 zeigen aufsteigend nach der Strahlungsdosis das zentrale Dentin jeweils im unbestrahlten und bestrahlten Zustand. Die in Abschnitt 4.2.1 angeführten morphologischen Parameter (Länge und Aufzweigungen der Fibrillen, interfibrillärer Zwischenraum) müssen für die transmissionselektronenmikroskopische Analyse um den strukturellen Parameter der bandenartigen Querstreifung erweitert werden.

Die Abbildungen zeigen all diese Parameter sowohl im unbestrahlten als auch im bestrahlten Fall. Im Gegensatz zur rasterelektronenmikroskopischen Analyse ist hier die für Typ-I Kollagen charakteristische bandenartige Querstreifung deutlicher zu erkennen. Darüber hinaus sind die Aufzweigungen der einzelnen Fibrillen zu sehen.

Vergleicht man weiterhin für den Fall eines möglichen Maximaleffekts die mit 60 Gy bestrahlten Proben (Abbildung 32 b) mit der unbestrahlten Referenz (Abbildung 32 a), so ist zunächst keine Änderung in der Fibrillenlänge festzustellen. Außerdem bleibt die Substruktur bezüglich der Aufzweigungen jeder einzelnen Fibrille nahezu unverändert. Gleiches lässt sich für deren bandenartige Struktur sowie den interfibrillären Zwischenraum festhalten. Die Analyse der Detailaufnahmen mit einer höheren Vergrößerung von 87.000fach (Abbildung 33) bestätigt dieses Ergebnis. Weiterhin zeigte der Vergleich innerhalb der anderen Bestrahlungsgruppen das gleiche Resultat.

Somit zeigen die Ergebnisse der transmissionselektronischen Analyse, dass sich die kollagene Substruktur durch eine Bestrahlung im gewählten Dosisbereich sowohl in morphologischer als auch in struktureller Hinsicht nicht verändert.

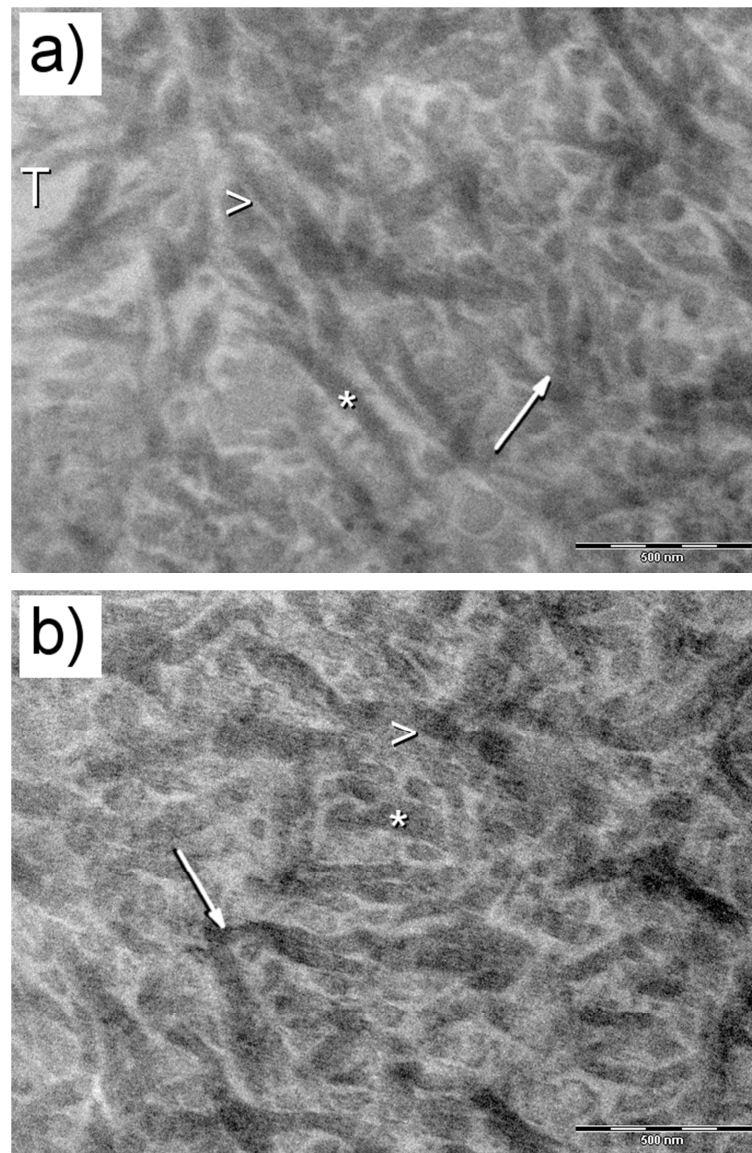


Abbildung 30: TEM-Aufnahme des entkalkten Dentins einer unbestrahlten (a) sowie einer mit 5 Gy bestrahlten (b) Probe bei 43.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind Kollagenfibrillen mit ihrer charakteristischen Querstreifung (*) sowie deren Aufzweigungen (→). Ebenfalls zu sehen ist der interfibrilläre Zwischenraum und bei a) der Rand eines Tubulus (T).

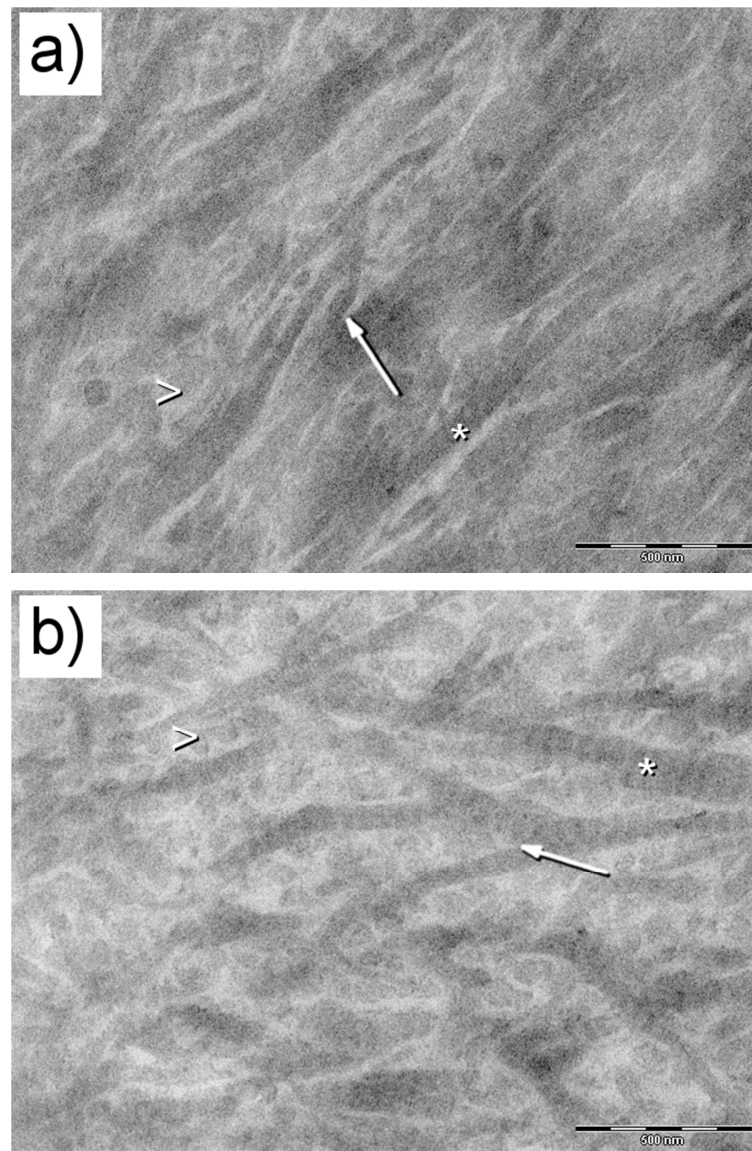


Abbildung 31: TEM-Aufnahme des entkalkten Dentins einer unbestrahlten (a) sowie einer mit 20 Gy bestrahlten (b) Probe bei 43.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind Kollagenfibrillen mit ihrer charakteristischen Querstreifung (*) sowie deren Aufzweigungen (→). Ebenfalls zu sehen ist der interfibrilläre Zwischenraum (>).

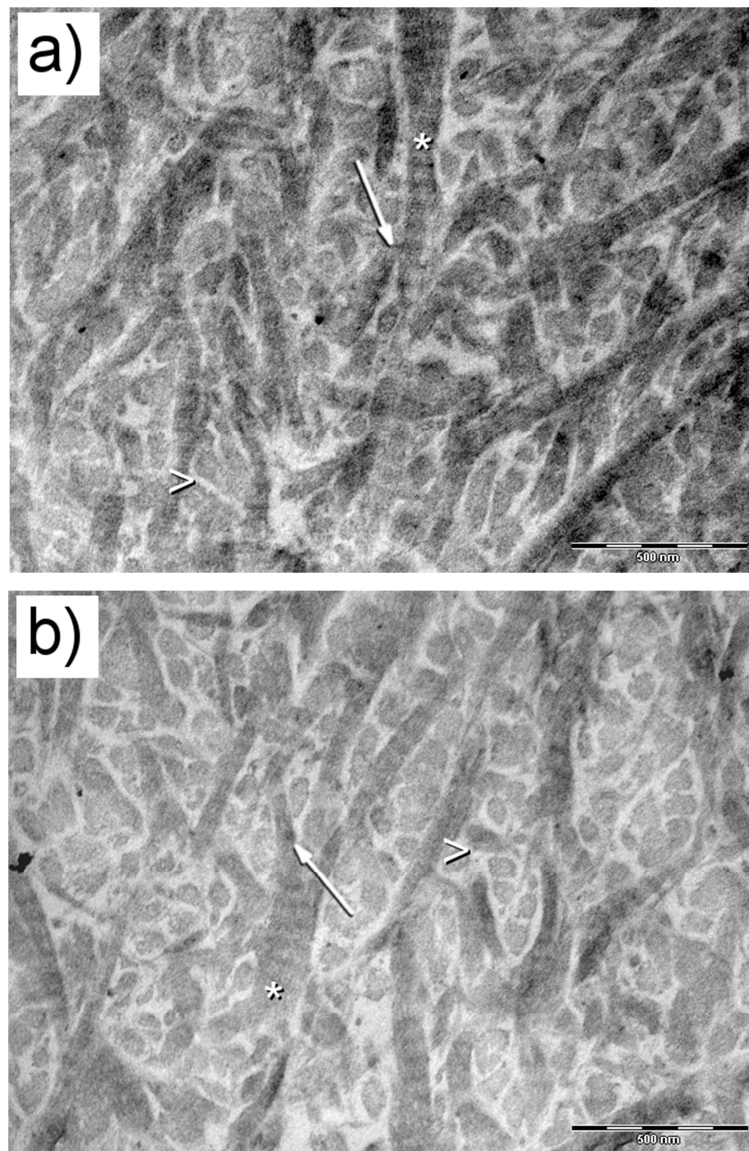


Abbildung 32: TEM-Aufnahme des entkalkten Dentins einer unbestrahlten (a) sowie einer mit 60 Gy bestrahlten (b) Probe bei 43.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind Kollagenfibrillen mit ihrer charakteristischen Querstreifung (*) sowie deren Aufzweigungen (→). Ebenfalls zu sehen ist der interfibrilläre Zwischenraum (>).

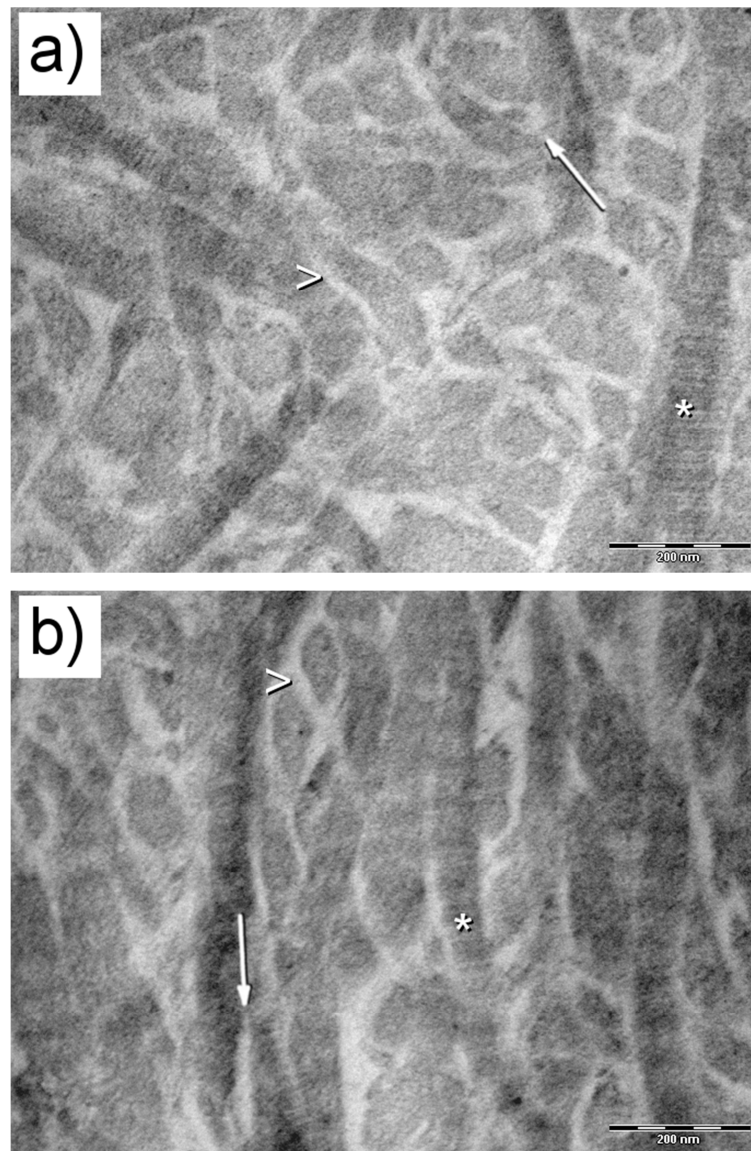


Abbildung 33: TEM-Aufnahme des entkalkten Dentins einer unbestrahlten (a) sowie einer mit 60 Gy bestrahlten (b) Probe bei 87.000facher Vergrößerung. Zu sehen sind Kollagenfibrillen mit ihrer charakteristischen Querstreifung (*) sowie deren Aufzweigungen (→). Ebenfalls zu sehen ist der interfibrilläre Zwischenraum (>).

5 Diskussion und Schlussfolgerung

5.1 Diskussion von Material und Methodik

5.1.1 Herkunft der Proben

Für die vorliegenden Versuche wurden ausschließlich humane, kariesfreie Weisheitszähne verwendet. Somit ließ sich eine Veränderung der Härte oder der Struktur durch kariöse Prozesse ausschließen. Um weitere Veränderungen zu verhindern, wurden die Zähne sofort nach der Extraktion kurzzeitig in 25%igem Alkohol gelagert und noch am selben Tag bis zur Weiterverarbeitung bei -81°C tiefgefroren. Weiterhin lassen sich die Versuchsergebnisse direkt auf den Menschen übertragen, da ausschließlich humane Zähne verwendet wurden.

5.1.2 Verwendung von Zahnpaaren

Bei allen Versuchen wurde immer mit Zahnpaaren gearbeitet. So bilden zwei Weisheitszähne von einem Patient ein Zahnpaar. Jeweils einer der Zähne wurde bestrahlt, der zweite wurde als Referenz verwendet. Abgesehen von der Bestrahlung wurden beide Zähne des Zahnpaars absolut gleich behandelt. Um eine Verwechslung zwischen den Paaren sowie innerhalb des Zahnpaars auszuschließen, wurde den Zähnen eine Nummer eingraviert. Somit war die verwechslungsfreie Identifikation problemlos möglich. Durch diese Methode können erstmals die Ergebnisse zweier Zähne desselben Patienten in bestrahlter und unbestrahlter Form verglichen werden. Bei allen Versuchen wurden somit immer zwei Zähne desselben Patienten verglichen. Interindividuelle Schwankungen, wie sie gerade im Dentin häufig vorkommen, können somit erheblich reduziert werden.

5.1.3 Bestrahlung

Die zu bestrahlenden Proben wurden alle komplett in Impregum eingebettet. Sie waren von einer definierten Impregumschicht von 1,5 cm bedeckt. Somit wurden die umgebenden Gewebe simuliert und eine gleiche, definierte Strahlendosis an den Zähnen sichergestellt.

Die Zähne wurden mit Einzeldosen von 2, 5, 10, 20 und 60 Gy bestrahlt. Somit war gewährleistet, mögliche Veränderungen sowohl bei hohen als auch bei niedrigeren Strahlendosen untersuchen zu können. Das ist wichtig, da die Zähne einerseits bei der Bestrahlung oft am Rande des Strahlenfeldes liegen und deshalb nur einem geringeren Teil der Gesamtdosis ausgesetzt sind. Andererseits konnte durch die Bestrahlung mit hohen Dosen auch ein Maximaleffekt untersucht werden.

Es handelt sich bei den Versuchen um In-vitro-Studien. Wie bereits beschrieben, wurden ausschließlich extrahierte und damit biologisch nicht mehr vitale Zähne verwendet. Folglich besitzen die Proben keinerlei regeneratives Potential mehr. Allgemein werden in der klinischen Behandlung von Tumorpatienten fraktionierte Bestrahlungen durchgeführt (Bourhis et al. 2005), um zwischen den einzelnen Bestrahlungen eine Regeneration des vitalen Gewebes zu ermöglichen. Mit einer solchen Regeneration ist in den hier durchgeführten Versuchsreihen nicht zu rechnen. Aus diesem Grund wurden die Proben mit einer Einmaldosis zwischen 2 und 60 Gy bestrahlt. Dabei entsprechen 2 Gy einer Einzeldosis bei einer fraktionierten Bestrahlung. 60 Gy liegen im Bereich der Gesamtdosis einer tumortherapeutischen Bestrahlung (Bourhis et al. 2005). Damit simulieren diese beiden Strahlungsdosen die minimalen und maximalen Strahlungsdosen.

5.1.4 Thermische Wechselbelastung

Bereits Mühlemann beschrieb 1945, dass Strahlenkaries nicht unmittelbar nach einer Bestrahlung auftritt. Vielmehr muss eine Latenzzeit von sechs bis sieben Monaten angenommen werden. Daraus ergab sich der in dieser Arbeit gewählte Zeitraum der Alterung. So ermöglichte eine thermische Wechselbelastung von 10.000 Zyklen wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, die Simulation einer Alterung der Zähne von circa einem Jahr (Xu et al. 2002, Gale et al. 1999). Somit ist es gelungen, in den Experimenten dieser Arbeit die klinische Situation in diesem Punkt optimal zu berücksichtigen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Härte

Härtemessungen sind im Kontext von Strahlungseffekten auf Dentin von besonderer Relevanz, da sie als ein Indikator dienen, biomechanische Eigenschaftsänderungen im Gewebe zu detektieren (Moscovich et al. 1999).

Dentin weist in seinen unterschiedlichen Zonen unterschiedliche Härten auf. Daher galt es, den Härteverlauf eines bestrahlten Zahnes vom Schmelz über die Schmelz-Dentin-Grenze bis ins zentrale Dentin aufzunehmen. Hierzu müssen lokal auf einer Distanz von wenigen Millimetern mehrere Härtemessungen (in dieser Arbeit acht Messungen) durchgeführt werden. Methodisch bedingt ist die Ortsauflösung der Härtemessverfahren von der Größe des Härteabdrucks bestimmt. Für lokale Messungen im Submillimeter-Bereich wurde die Mikrohärtmessung verwendet. Die Mikrohärtmessung wurde entwickelt, um die lokale Härte an einzelnen Gefügebestandteilen oder dünnen Schichten, wie dem Dentin, zu messen (Bückle et al. 1965). Die Methode der Mikrohärtmessung ist damit die Methode der Wahl, die Härte in ihrem Verlauf lokal von der Schmelz-Dentin-Grenze bis ins zentrale Dentin abzubilden.

Gegenwärtig wird der Einfluss der Bestrahlung auf die Härte kontrovers diskutiert. So konnte eine Reduktion der Knoop-Härte von humanem Dentin nach einer fraktionierten Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60 Gy nachgewiesen werden (Kielbassa et al. 1999). Als Ursache vermutet man einerseits eine radiogen bedingte Änderung des Kristallgefüges und das Auftreten langlebiger Radikale im bestrahlten Apatit. Andererseits können beschriebene Brüche in den Molekülen der Kollagenmatrix (Fisher et al. 1971, Springer et al. 2005) eine mögliche Erklärung geben. Der Anteil von Kollagen und kollagenartigen Verbindungen im Dentin beträgt bis zu 90 % (Kawasaki et al. 1997). Dieser Anteil ist bis zu 30 % für die Zugfestigkeit des Dentins verantwortlich (Kielbassa et al. 1999). So zeigten Kielbassa et al. (1997) in einer weiteren Studie einen großen Härteverlust in der Knoop-Härte von 63 KHN vor der Bestrahlung auf 9 KHN danach (Kielbassa et al. 1997b). Auch Fränzel et al. (2009) bestätigten einen Härteverlust nach Bestrahlung.

Andere Studien zur Dentinmikrohärte nach einer Bestrahlung zeigen hingegen keine Härteabnahme. Der Vergleich verschiedener Studien ist aufgrund der unterschiedlichen Strahlendosen und Versuchsbedingungen schwierig. So gibt es Studien, die zeigen, dass es keinen Unterschied zwischen der Härte von bestrahltem und unbestrahltem Dentin gibt (Rahn

et al. 1989). Andere Studien zeigen eine geringe, nicht signifikante Abnahme von 72 VHN vor auf 68 VHN nach der Bestrahlung (Markitziu et al. 1986).

Zielstellung dieser Arbeit war es, in diesem Themenkomplex die These eines Härteverlustes in Folge einer Bestrahlung systematisch zu überprüfen. Dafür wurden jeweils an zwei Zähnen desselben Patienten Mikrohärtemessungen durchgeführt. Dabei wurde einer der beiden Zähne zuvor bestrahlt, der andere diente als Referenz.

Auffällig waren zunächst die Unterschiede der Schmelzhärte besonders im äußeren Schmelzbereich. Eine Systematik hinsichtlich eines möglichen Bestrahlungseffekts konnte dabei nicht verifiziert werden. Diese Variationen können einerseits durch eine unvollständige präeruptive Schmelzreifung erklärt werden. Andererseits muss angenommen werden, dass präparativ eingebrachte Zerrüttungen, vor allem an der Schmelzoberfläche, vorliegen (Schemel et al. 1984). Letztere führen zu einer Änderung in der Gefügestruktur und damit in der gemessenen Härte. Der letztere Effekt wird in dieser Studie als dominierend angenommen.

Auch die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse zeigte keine signifikante Änderung der Mikrohärte durch eine Bestrahlung. Die Frage, ob die Mikrohärte an Schmelz und Dentin zum einen unabhängig von der Bestrahlung und zum andern unabhängig von der Bestrahlungsdosis ist, kann somit mit ja beantwortet werden. Lediglich in der 20-Gy-Gruppe trat beim T-Test im Dentin eine Signifikanz auf. Diese ist darauf zurückzuführen, dass in dieser Messreihe die Streuung der Messwerte äußerst gering ist. Somit ist diese Signifikanz nicht von klinischer Relevanz.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse keine signifikanten Änderungen in den Härteverläufen im Schmelz und Dentin. Somit stützen die Ergebnisse die These, dass keine signifikanten Änderungen der biomechanischen Eigenschaften (wie sie sich in Härtemessungen widerspiegeln) in Folge einer Bestrahlung auftreten.

5.2.2 Struktur

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der systematischen Analyse von radiologischen Strahlungseffekten am kollagenen Netzwerk. Die Fokussierung auf das Kollagen im Dentin ergab sich vor dem Hintergrund, dass über direkte Schäden an Zähnen, vor allem im Dentin und an der Schmelz-Dentin-Grenze, berichtet wurde. Grötz et al. (1997) zeigten weiter, dass eine direkte Schädigung von anorganischem Hydroxylapatitkristallen unwahrscheinlich ist. Aus aktuellen Studien von Soares et al. (2010) konnte letztlich der Schluss abgeleitet werden, dass sich γ -Strahlen am stärksten auf die organische Komponente des Dentins auswirken.

Durch eine kombinierte raster- und transmissionselektronenmikroskopische Analyse sollte gezielt das Kollagennetzwerk auf Bestrahlungseffekte untersucht werden. Da das Kollagennetzwerk deutlicher an entkalkten Proben zu erkennen ist (Schumacher et al. 1990), wurde in dieser Arbeit ausschließlich der entkalkte Bereich der Dentinproben betrachtet. Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2 zeigten, dass die in dieser Arbeit gewählten Strahlungsdosen zu keiner Änderung in morphologischen und strukturellen Merkmalen des Kollagennetzwerkes führten.

Dieses Resultat kann im Kontext des Ursachenkomplexes der Strahlenkaries verstanden werden. Letztere ist demnach sowohl durch indirekte als auch durch direkte Ursachen und somit multifaktoriell bedingt.

Im Wesentlichen erhöhen folgende indirekte Faktoren die Anfälligkeit für Strahlenkaries (Vissink et al. 2003a):

- strahlenbedingte Veränderung des Speicheldrüsengewebes sowie dadurch bedingte Veränderungen in der Speichelzusammensetzung und in der Speichelflussmenge
- strahlenbedingte Veränderung der Mikroflora im Mundraum hin zu kariogenen Bakterien wie *Streptococcus mutans*
- durch eine Mukositis bedingte Umstellung der Ernährungsgewohnheiten hin zu kariogener Kost

Eine Bestrahlung verändert die Speichelqualität und Quantität bereits kurz nach Bestrahlungsbeginn erheblich. Die Speicheldrüsen reagieren hinsichtlich ihrer Funktion akut radiosensibel (Leslie et al. 1994). Nach einer Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 50-70 Gy kommt es in erster Linie zum Untergang der serösen Drüsenacini (Frank et al. 1965, Rubin et al. 1976, Handtmann et al. 1990, Folwaczny et al. 2001). So sinkt die Sekretionstätigkeit der Glandula parotidea bereits nach zwei bis drei Bestrahlungen mit 2-2,5

Gy erheblich. Die muköse Glandula submandibularis ist etwas weniger strahlenempfindlich, wird jedoch sechs Monate nach einer applizierten Gesamtdosis von 60 Gy auch fibrotisch. Bereits in der ersten Bestrahlungswoche sinkt die stimulierte Speichelflussrate um mindestens 50 % ab. Die Gesamtspeichelmenge liegt nach Abschluss einer Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60 Gy bei 5 % des Ausgangswertes (Engelmeier et al. 1983, Willich et al. 1988, Spak et al. 1994, Cooper et al. 1995, Dirix et al. 2006). Katz (1982) zeigte, dass die unstimulierte Speichelsekretion nach Bestrahlung mit 50-70 Gy sogar vollständig versiegt.

Aber auch die Speichelzusammensetzung ändert sich. Da die serösen Drüsenanteile strahlensensibler sind, wird der Speichel viskoser (Cooper et al. 1995). Darüber hinaus konnten Hannig et al. (2006) erstmals zeigen, dass sich auch die Proteinzusammensetzung ändert. Demnach sinkt die Konzentration der niedermolekularen Proteine, wie beispielsweise der sauren und basischen prolinreichen Proteine, Cystatin, Histatin und Staterin, signifikant. Auch wurde beobachtet, dass der pH-Wert des Speichels nach einer Strahlentherapie von vorher 6,5 auf unter 5,0 abfällt (Dreizen 1976, Frank et al. 1965). Es ergibt sich eine verringerte Pufferkapazität gegenüber Säuren, die letztlich durch eine geringere Konzentration von Bicarbonat im Speichel verursacht wird (Dreizen 1976). Auch eine Elektrolytverschiebung ist zu beobachten (Rahn et al. 1989). Der Immunglobulingehalt geht deutlich zurück und als Folge des Azinuszellschadens kommt es zu einer Vermehrung der Speichelamylase (Thiel 1989).

In Folge der Speichelveränderungen tritt eine Änderung der natürlichen oralen Flora auf (Brown 1975). Im Wesentlichen steigt dabei die Anzahl kariogener Mikroorganismen wie *Streptococcus mutans*. Während bei unbestrahlten Patienten *S. mutans* nur 1,8 % des gesamten Streptokokkengehalts ausmacht, konnten Keene et al. (1981) einen signifikanten Anstieg der relativen *S. mutans*-Zahl auf 24,3 % interproximal und sogar auf 41,2 % buccolingual zeigen.

Aufgrund der strahlungsbedingten, sehr schmerzhaften Mukositis tritt eine Verschlechterung der Mund- und Zahnhygiene auf. Zusätzlich dazu tritt temporär eine Reduktion des Geschmacks- sowie des Geruchssinns auf. Diese Faktoren führen zu einer Umstellung der Ernährungsgewohnheiten. Aus einer vermehrt kohlenhydratreichen, breiigen Nahrungsaufnahme resultiert ein gesteigertes Kariesrisiko.

Unter direkten Strahlenschäden werden Schädigungen des Zahnes selbst zusammengefasst. Dass direkte Auswirkungen der Bestrahlung existieren, zeigten Willich et al. (1988) in einer klinischen Untersuchung. Ein statistisch signifikanter erhöhter Karieszuwachs an Zähnen, die im Strahlenfeld lagen, verglichen mit Zähnen außerhalb des Strahlenfeldes, wurde festgestellt. Neuere Studien identifizieren diesbezüglich den Schmelz-Dentin-Übergang als Locus minoris resistentiae (Pioch et al. 1992, Pioch et al. 1997, Grötz et al. 1997). Lokale Rissbildungen infolge von radiologischer Bestrahlung ermöglichen hier einen erhöhten bakteriellen Angriff. Letzterer senkt die Grenzflächenstabilität.

Raab et al. stellten 1990 in einer rasterelektronenmikroskopischen Studie fest, dass bei in-situ bestrahlten Zähnen gehäuft lakunäre Defekte an der Schmelz-Dentin-Grenze in der Nähe kariöser Läsionen zu finden waren. Diese Defekte konnten bei unbestrahlten Patienten mit einer medikamentös bedingten Xerostomie im Bereich kariöser Glattflächenläsionen nicht gefunden werden. Auch Handtmann et al. (1990) konnten derartige Spalten im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze bei bestrahlten Patienten nachweisen. Anneroth et al. (1985) beschrieben derartige Spaltbildungen im Bereich der Dentin-Zement-Grenze von bestrahlten Patienten.

Neben diesem lokalen Effekt wird außerdem eine generelle Schädigung des Kollagennetzwerks im Dentin auch in zentralen bis hin zu pulpanahen Bereichen diskutiert. So konnten Springer et al. (2005) eine erhöhte Menge reifer Kollagenfragmente Hydroxylsypyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) im Pulpagewebe von in vitro bestrahlten Zähnen feststellen. Die erhöhte Konzentration von HP und LP deutet auf eine erhöhte Konzentration von gespaltenem Kollagen hin. Diese Studie zeigt somit, dass eine Bestrahlung zur Destruktion von Kollagen führt. In einer weiteren In-vitro-Studie konnte ebenfalls über eine erhöhte Konzentration von HP, LP und Hydroxyprolin (Hyp) eine Spaltung von Kollagen und somit ein direkter radiogener Schaden der Extrazellulärmatrix an Knochen-, Periost- und Hautgewebe nachgewiesen werden (Acil et al. 2007). Eine Destruktion des Kollagens im Zahnhartgewebe konnte jedoch nicht verifiziert werden. Das steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit; es konnte keine Destruktion der Kollagenfibrillen im Dentin gezeigt werden.

Alai-Omid untersuchte 2008, ob die Bestrahlung eines Dentinpulvers mit 10 Gy die gelatinolytische Aktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) im Dentin steigert. MMPs sind eine Gruppe zinkabhängiger Endopeptidasen, die in der Lage sind, die organische Matrix im Dentin zu degradieren. Im Mittel konnten im bestrahlten Dentin gegenüber dem Referenzdentin erhöhte Werte gemessen werden. Der Anstieg war jedoch nicht signifikant

(Alai-Omid 2008). Das Fehlen der Schmelz-Dentin-Grenze in diesen Versuchen lässt vermuten, dass eine generelle Schädigung des dentinen Kollagens zum direkten Ursachenkomplex der Strahlenkaries beiträgt.

Die genannten Arbeiten deuten auf eine Veränderung des Kollagens im Dentin hin. Eine exakte Verifikation dieser Änderungen sowie deren strukturelle Beschreibung blieben jedoch offen.

Die Versuche dieser Arbeit hatten zum Ziel, die direkten Auswirkungen von Bestrahlung auf das Kollagen des Dentins, wie sie die oben aufgeführten Arbeiten andeuten, zu untersuchen. Hierzu sind, neben der Bestrahlung, das den Zahn umgebende Gewebe während der Bestrahlung sowie eine Zahnalterung von einem Jahr berücksichtigt worden.

Wie einleitend zusammengefasst, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit nicht auf systematische strukturelle strahlungsbedingte Veränderungen des Kollagens hin. Eine zu dieser Arbeit in Ergänzung stehende Studie zum Nachweis einer strahlungsbedingten Steigerung der gelatinolytischen Aktivität von MMPs im Dentin konnte keine signifikant erhöhten Werte nachweisen (Faber 2012). Die experimentellen Bestrahlungsparameter in der Arbeit von Faber 2012 sind gleich denen dieser Arbeit. Eine Destruktion des Kollagens ist auch auf Grundlage dieser MMP-Analyse nicht zu erwarten. Folglich stützen die Ergebnisse von Faber (2012) durch Wahl einer indirekten Methodik zum Nachweis von Veränderungen im Kollagen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Ein fehlender Einfluss einer ausschließlich radiologischen Bestrahlung auf das Kollagen des Dentins, wie es die vorliegende Arbeit aufzeigt, erklärt sich, wenn eine Wechselwirkung zwischen indirekten und direkten Ursachen angenommen wird. Der gegenwärtige Wissensstand geht nicht davon aus, dass einer der beschriebenen Ursachenkomplexe, indirekt oder direkt, alleine für eine Erklärung des Phänomens Strahlenkaries herangezogen werden kann. Vielmehr ist davon auszugehen, dass synergetische Effekte zwischen den entsprechenden Mechanismen bestehen. Pioch et al. (1998) schlussfolgern sogar, dass sich indirekte und direkte Faktoren gegenseitig verstärken. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese allgemeine Annahme, dass Strahlenkaries eine Kombinationsschädigung der Zahnhartsubstanzen ist.

Demnach genügt die separate Wirkung von radiologischer Strahlung (direkter Faktor) kombiniert mit einer Alterung nicht, um eine organische Gewebsschädigung im Dentin hervorzurufen. Vielmehr ist anzunehmen, dass in Experimenten indirekte Faktoren Berücksichtigung finden müssen, um die reale Situation im Mundraum möglichst detailliert und in-vitro anzunähern.

Optimal ist diesbezüglich eine Studie an in-vivo bestrahlten humanen Zähnen, die auch nach Abschluss der Bestrahlung mindestens die Latenzzeit von sechs bis sieben Monaten (Mühlemann et al. 1945) im Mundraum kariesfrei verblieben sind. Interessant an solchen Experimenten wären ähnliche Fragestellungen, wie sie in dieser Arbeit aufgeworfen wurden und damit auf die Strukturveränderungen im Dentin abzielen.

5.2.3 Schlussfolgerungen

Schlussfolgerung aus Fragestellung 1

Zunächst wurde die Fragestellung nach dem radiologischen Einfluss auf den Härteverlauf vom Schmelz über die Schmelz-Dentin-Grenze bis ins zentrale Dentin bearbeitet. Als Schlussfolgerung ließ sich keine statistisch signifikante Änderung des Härteverlaufs nachweisen.

Schlussfolgerung aus Fragestellung 2

Der Fokus der Arbeit lag auf Untersuchungen der Fragestellung, inwiefern die Bestrahlung auch zu einer systematischen Destruktion des Kollagens im Dentin führt und inwiefern daraufhin strukturelle Veränderungen zu beobachten sind. Umfassende rasterelektronenmikroskopische und transmissionselektronenmikroskopische Studien konnten zeigen, dass keine morphologischen und strukturellen Veränderungen unter den gewählten experimentellen Bedingungen stattfinden.

6 Literaturverzeichnis

1. Açıl Y, Springer IN, Niehoff P, Gaßling V, Warnke PH, Açmaz S, Sönmez TT, Kimmig B, Lefteris V, Wiltfang J (2007) Proof of direct radiogenic destruction of collagen in vitro. *Strahlentherapie und Onkologie* 183:374-379.
2. Alai-Omid M (2008) Experimentelle Untersuchung zum Nachweis und zur Modifikation der enzymatischen Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen im Dentin. Medizinische Dissertation, Homburg/Saar.
3. Anneroth G, Holm LE, Karlsson G (1985) The effect of radiation on teeth. A clinical, histological and microradiographic study. *International journal of oral surgery* 14:269-274.
4. Barcellos-Hoff MH and Ravani SA (2000) Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer research* 60:1254-1260.
5. Bartel-Friedrich S, Friedrich RE, Lautenschlager C, Holzhausen HJ, Moll R (2000) Dose-response relationships on the expression profile of cytokeratins and vimentin in rat submandibular glands following fractionated irradiation. *Anticancer Research* 20:4917-4926.
6. Beetz I, Rößler R, Kielbassa AM (1999) Kariesprophylaxe während und nach einer Strahlentherapie. *Prophylaxe Impuls* 3:156-163.
7. Bourhis J, Etessami A, Lusinchi A (2005) New trends in radiotherapy for head and neck cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 16:255-257 .
8. Brown LR, Dreizen S, Handler S, Johnston DA (1975) Effect of radiation-induced xerostomia on human oral microflora. *Journal of dental research* 54:740-750.
9. Bückle H and Frank K (1965) *Mikrohärteprüfung und ihre Anwendung*. Union Verlag Berlin.
10. Cooper JS, Fu K, Marks J, Silverman S (1995) Late effects of radiation therapy in the head and neck region. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 31:1141-1164.
11. Del Regato J (1939) Dental lesions observed after roentgentherapy in cancer of the buccal cavity, pharynx and larynx. *American journal of roentgenology* 42:404–410.

12. Dirix P, Nuyts S, Van den Boegart W (2006) Radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: a literature review. *Cancer* 107:2525-2534.
13. Dreizen S, Brown LR, Handler S, Levy BM (1976) Radiation-induced xerostomia in cancer patients. Effect on salivary and serum electrolytes. *Cancer* 38:273-278.
14. Eggert JH, Dumbach J, Steinhauser EW (1985) Etiology and therapy of osteoradionecrosis of the mandibular. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift* 40:2-11.
15. Emilson CG (1994) Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *Journal of dental research* 73:682-691.
16. Engelmeier RL and King GE (1983) Complications of head and neck radiation therapy and their management. *The Journal of prosthetic dentistry* 49:514-522.
17. Epstein JB and Stevenson-Moore P (1986) Benzylamine hydrochloride in prevention and management of pain in oral mucositis associated with radiation therapy. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 62:145-148.
18. Featherstone J, Ten Cate J, Shariati M, Arends J (1983) Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries research* 17:385-391.
19. Filippi A (1993) Osteoradionekrose des Kieferknochens durch Prothesendruckstellen. *Quintessenz* 44:963-968.
20. Fisher BV, Morgan RE, Phillips GO, Wardale HW (1971) Radiation damage in calcium phosphates and collagen: an interpretation of ESR spectra. *Radiation research* 46:229-235.
21. Folwaczny M and Hickel R (2001) Aspekte der zahnärztlichen Betreuung immunsupprimierter Patienten. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 56:285.
22. Frank RM, Herdly J, Philippe E (1965) Acquired dental defects and salivary gland lesions after irradiation for carcinoma. *Journal of the American dental association* 70:868-883.
23. Fränzel W and Gerlach R (2009) The irradiation action on human dental tissue by X-rays and electrons: a nanoindenter study. *Zeitschrift für Medizinische Physik* 19:5-10.
24. Fujita M, Tanimoto K, Wada T (1986) Early radiographic changes in radiation bone injury. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 61:641-644.
25. Gale M and Darvell B (1999) Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *Journal of dentistry* 27:89-100.

26. Goldstein J, Newbury D, Joy D, Lyman C, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L, Michael J (2007) Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. 3. Auflage, Springer Verlag, New York.
27. Gotthardt F (1922) Über Zahnschäden nach Röntgenstrahlungen. Röntgen-Gesellschaft 13:139-142.
28. Grötz KA, Diwo T, Henrich G, Wagner W (1994) Wundheilungsstörungen nach chirurgischer Zahnsanierung prä und post radiationem bei malignen Kopf-Hals-Tumoren. Deutsche zahnärztliche Zeitschrift 49:1036–1039.
29. Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W (1997) Neue Erkenntnisse zur Ätiologie der sogenannten Strahlenkaries. Nachweis direkter radiogener Veränderungen an der Schmelz-Dentin-Grenze. Strahlentherapie und Onkologie 173:668-676.
30. Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W (1998) Histotomographische Untersuchungen zur Frage direkt radiogener Schmelzveränderungen. Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2:85-90.
31. Grötz KA, Al-Nawas B, Kutzner J (1999) Retrospektive Analyse zur Ätiologie der infizierten Osteoradionekrose. Strahlentherapie und Onkologie 175: Suppl 1:95.
32. Grötz KA, Riesenbeck D, Brahm R, Seegenschmiedt MH, Al-Nawas B, Dörr W, Kutzner J, Willich N, Thelen M, Wagner W (2001) Chronische Strahlenfolgen an den Zahnhartgeweben („Strahlenkaries“). Strahlentherapie und Onkologie 177:96-104.
33. Hackethal E (2013) Experimentelle Untersuchung zum Einfluss der in vitro γ -Bestrahlung auf die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen -2, -8 und -9 im Dentin. Medizinische Dissertation in Vorbereitung, Homburg/Saar.
34. Handtmann S, Huttemann H, Schulte W, Ehninger G (1990) Severe hard tooth structure decay following full body radiotherapy prior to bone marrow transplantation. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 45:701-705.
35. Hannig M, Dounis E, Henning T, Apitz N, Stößer L (2006) Does irradiation affect the protein composition of saliva? Clinical oral investigations 10:61-65.
36. Hannig M and Hannig C (2007) Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? Oralprophylaxe 29:73–82.
37. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, Kumagai H, Kudou Y, Kubota M, Oguchi H (2003) SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. Journal of biomedical materials research 66:287-298.

38. Hellwig E, Klimek J, Attin T (2006) Einführung in die Zahnerhaltung. 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, Jena.
39. Herrstedt J (2000) Prevention and management of mucositis in patients with cancer. *International journal of antimicrobial agents* 16:161-163.
40. Herzog M, Samek M, Siranli F (1986) Zur Indikation der zahnärztlich-chirurgischen Sanierung bei Strahlentherapie. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 41:449-451.
41. Horiot JC, Bontemps P, Van den Bogaert W, Le Fur R, van den Weijngaert D, Bolla M, Bernier J, Lusinchi A, Stuschke M, Lopez-Torrecilla J (1997) Accelerated fractionation (AF) compared to conventional fractionation (CF) improves loco-regional control in the radiotherapy of advanced head and neck cancers: results of the EORTC 22851 randomized trial. *Radiotherapy and oncology* 44:111-121.
42. Jansma J, Buskes JA, Vissink A, Mehta DM, 's-Gravenmade EJ (1988) The effect of X-ray irradiation on the demineralization of bovine dental enamel. A constant composition study. *Caries research* 22:199-203.
43. Jansma J, Borggreven JM, Driessens FC, 's-Gravenmade EJ (1990) Effect of X-ray irradiation on the permeability of bovine dental enamel. *Caries research* 24:164-168.
44. Jansma J, Vissink A, Bouma J, Vermey A, Panders AK, 's-Gravenmade EJ (1992a) A survey of prevention and treatment regimens for oral sequelae resulting from head and neck radiotherapy used in Dutch radiotherapy institutes. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 24:359-367.
45. Jansma J, Vissink A, Spijkervet FKL, Roodenburg JLN, Panders AK, Vermey A, Szabó BG, 's-Gravenmade EJ (1992b) Protocol for the prevention and treatment of oral sequelae resulting from head and neck radiation therapy. *Cancer* 70:2171-2180.
46. Jansma J, Vissink A, Jongebloed WL, Retief DH, 's-Gravenmade EJ (1993) Natural and induced radiation caries: A SEM study. *American journal of dentistry* 6:130-136.
47. Jentsch H, Göcke R, Szymanska D, Beetke E, Seyfarth M, Tessenow W (1991) The quantitative determination of resistance factors in the saliva of patients with very high caries involvement. *Deutsche Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde mit Zentralblatt* 79:343-347.
48. Johansson A, Sorvari R, Meurman J, Birkhed D (1998) In vitro effect of citric acid on deciduous and permanent enamel. *Caries research* 32:310.

49. Jones S and Boyde A (1984) Ultrastructure of dentin and dentinogenesis. *Dentin and dentinogenesis* 1:81-134.
50. Kärcher H (1984) Zahnärztliche Aufgabenstellungen während einer Strahlentherapie im maxillo-fazialen Bereich. *Stomatologie* 81:103-108.
51. Katz S (1982) The use of fluoride and chlorhexidine for the prevention of radiation caries. *Journal of the American dental association* 104:164-170.
52. Kawasaki K and Featherstone J (1997) Effects of collagenase on root demineralization. *Journal of dental research* 76:588-595.
53. Keene HJ, Daly T, Brown LR, Dreizen S, Drane JB, Horton IM, Handler SF, Perkins DH (1981) Dental caries and *Streptococcus mutans* prevalence in cancer patients with irradiation-induced xerostomia: 1-13 years after radiotherapy. *Caries research* 15:416-427.
54. Ketterl W (1961) Studie über das Dentin der permanenten Zähne des Menschen. *Stomatologie* 14:148-162.
55. Kielbassa AM and Schilli K (1997a) Betreuung des tumortherapeutisch bestrahlten Patienten aus Sicht der Zahnerhaltung. *Zahnärztliche Mitteilungen* 87:2636–2647.
56. Kielbassa AM, Beetz I, Schendera A, Hellwig E (1997b) Irradiation effects on microhardness of fluoridated and non-fluoridated bovine dentin. *European journal of oral sciences* 105:444-447.
57. Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E (1999) Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Archives of oral biology* 44:243-251.
58. Kielbassa AM (2000) In situ induced demineralization in irradiated and non-irradiated human dentin. *European journal of oral sciences* 108:214-221.
59. Kielbassa AM, Schendera A, Schulte-Mönting J (2000) Microradiographic and microscopic studies on in situ induced initial caries in irradiated and nonirradiated dental enamel. *Caries research* 34:41-47.
60. Kielbassa AM (2004) Strahlentherapie im Kopf- und Halsbereich: Implikationen für Zahnärzte, HNO-Ärzte und Radiotherapeuten. Schlütersche Verlag, Hannover.
61. Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H (2006) Radiation-related damage to dentition. *The Lancet oncology* 7:326-335.

62. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW (2003) The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Critical reviews in oral biology and medicine* 14:13-29.
63. Klimek J (1997) Initiale Karies und ihre Behandlung. *Deutscher Zahnärztekalendar* 23-42.
64. Klimm W (1997) Kariologie: Leitfaden für Studierende und Zahnärzte. Hanser Fachbuchverlag, München, Wien.
65. Leist M (1926) Experimentelle Untersuchungen über die Einwirkung der Röntgenstrahlen und des Radiums auf die Zweite Dentition. *Stomatologie* 24:452-460.
66. Leist M (1927) Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen und des Radiums auf Zähne und Kiefer. *Strahlentherapie* 24:268-281.
67. Lenhard M, Rudat V, Staehle H (1994) Fracture toughness of human enamel after irradiation. *Journal of dental research* 73:978.
68. Leslie MD and Dische S (1994) The early changes in salivary gland function during and after radiotherapy given for head and neck cancer. *Radiotherapy and oncology* 30:26-32.
69. Lockhart PB and Clark J (1994) Pretherapy dental status of patients with malignant conditions of the head and neck. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 77:236-241.
70. Lüdin M and Müller O (1936) Zahnveränderungen nach protrahiert-fraktionierter Röntgenbestrahlung. *Strahlentherapie Onkologie* 56:644-649.
71. Marciani RD and Plezia RA (1974) Management of teeth in the irradiated patient. *Journal of the American dental association* 88:1021-1024.
72. Marciani RD and Ownby HE (1992) Treating patients before and after irradiation. *Journal of the American dental association* 123:108-112.
73. Markitziu A, Gedalia I, Rajstein J, Grajover R, Yarshanski O, Weshler Z (1986) In vitro irradiation effects on hardness and solubility of human enamel and dentin pretreated with fluoride. *Clinical preventive dentistry* 8:4-7.
74. Marshall GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M (1997) The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *Journal of dentistry* 25:441-458.
75. Matzker J and Schreiber J (1972) Synthetic saliva in the treatment of hyposialies, especially in radiation sialadenitis. *Zeitschrift für Laryngologie, Rhinologie, Otologie und ihre Grenzgebiete* 51:422-428.

76. Maupomé G, Diez-de-Bonilla J, Torres-Villasenor G, Andrade-Delgado L, Castano VM (1998) In vitro quantitative assessment of enamel microhardness after exposure to eroding immersion in cola drink. *Caries Research* 32:148-153.
77. Moscovich H, Creugers N, Jansen J, Wolke J (1999) In vitro dentine hardness following gamma-irradiation and freezing. *Journal of dentistry* 27:503-507.
78. Mühlemann HR (1945) Das Verhalten von Kiefer und Zähnen bei der Radiotherapie von malignen Tumoren der Mundhöhle und des Pharynx. Medizinische Dissertation, Zürich.
79. Nagler RM, Baum BJ, Fox PC (1996) A 2 week pair-fed study of early X-irradiation effects on rat major salivary gland function. *Archives of oral biology* 41:713-717.
80. Nalla R, Porter A, Daraio C, Minor A, Radmilovic V, Stach E, Tomsia A, Ritchie R (2005) Ultrastructural examination of dentin using focused ion-beam cross-sectioning and transmission electron microscopy. *Micron* 36:672-680.
81. Nanci A and Ten Cate AR (2008) Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 7. Auflage, Elsevier Verlag, New York.
82. Nilles A and Stoll P (1992) Caries prevention in radiotherapy of the head-neck area. *Laryngo- Rhino-Otologie* 71:561-563.
83. Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T (1983) The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *Journal of dental research* 62:7-10.
84. Osswald M (1963) Morphologische Strukturveränderungen in der Schmelz-Dentin-Grenze nach Radiotherapie. *Deutsche Stomatologie* 13:723-728.
85. Pashley DH (1991) Clinical correlations of dentin structure and function. *The journal of prosthetic dentistry* 66:777-781.
86. Pilz W (1985) Praxis der Zahnerhaltung und oralen Prävention. Barth Verlag, Leipzig.
87. Pioch T, Moller D, Staehle HJ, Hoppe W (1991) Solubility of enamel and synthetic hydroxylapatite on irradiation. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift* 46:413-415.
88. Pioch T, Golfels D, Staehle HJ (1992) An experimental study of the stability of irradiated teeth in the region of the dentinoenamel junction. *Endodontics & dental traumatology* 8:241-244.
89. Pioch T and Mayer T (1997) Mikroskopische Untersuchungen an Frakturflächen von Zähnen mit „radiogener Karies“. *Stomatologie* 97:19-25.

90. Pioch T (1998) Untersuchung über strahlenbedingte Veränderungen an Zahnhartsubstanzen. Habilitationsschrift, Heidelberg.
91. Poyton HG (1968) The effects of radiation on teeth. Oral surgery, oral medicine, and oral pathology 26:639-646.
92. Raab WH, Petschelt A, Voss A (1990) SEM study of radiogenic caries. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 45:425-427.
93. Rahn R, Kocjancic B, Urban T, Manegold R (1989) In vitro study of causes of radiation caries. Das Deutsche Zahnärzteblatt 98:701-703.
94. Rateitschak E, Rateitschak K, Hefti A, Lori A, Gratwohl A, Speck B (1988) Zahnärztliche Betreuung von Patienten mit Knochenmarkstransplantation. Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin 98:472-477.
95. Rößler R, Kreylos S, Klimek J (1995) The effect of X-ray irradiation on the demineralization of enamel and dentine. Journal of dental research 74: 536.
96. Rubin RL and Doku HC (1976) Therapeutic radiology – the modalities and their effects on oral tissues. Journal of the American dental association 92:731-739.
97. Schemel W, Hummel K, Krekeler G (1984) Härteprüfung an Schmelz, Dentin und Zement rezenter menschlicher Zähne. Schweizer Monatsschrift für Zahnmededizin 94:1029-1041.
98. Schiødt M and Hermund NU (2002) Management of oral disease prior to radiation therapy. Supportive care in cancer 10:40-43.
99. Schroeder H (1992) Orale structure biology. 4. Auflage, Thieme Verlag, New York.
100. Schüle H (1967) Clinical manifestations and prevention of radiation injuries to the teeth, mouth and jaws. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 22:103-126.
101. Schumacher G, Schmidt H, Böring H, Richter W (1990) Anatomie und Biochemie der Zähne. 4. Auflage, Fischer Verlag, Stuttgart.
102. Sciubba JJ and Goldenberg D (2006) Oral complications of radiotherapy. The Lancet Oncology 7:175-183.
103. Seidel W (2007) Werkstofftechnik. 7. Auflage, Hanser Verlag, München, Wien.
104. Sela M, Gedalia I, Shah L, Skobe Z, Kashket S, Lewinstein I (1994) Enamel rehardening with cheese in irradiated patients. American journal of dentistry 7:134-136.

105. Soares CJ, Castro CG, Neiva NA, Soares PV, Santos-Filho P, Naves LZ, Pereira PNR (2010) Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. *Journal of dental research* 89:159-164.
106. Sonabend E (1962) Strahlenschäden an Zähnen und Kiefer. Aus: Schuchardt K: (Hrsg.) Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie. Thieme Verlag, Stuttgart.
107. Spak CJ, Johnson G, Ekstrand J (1994) Caries incidence, salivary flow rate and efficacy of fluoride gel treatment in irradiated patients. *Caries research* 28:388-393.
108. Springer IN, Niehoff P, Warnke PH, Böcek G, Kovács G, Suhr M, Wiltfang J, Açıl Y (2005) Radiation caries – radiogenic destruction of dental collagen. *Oral oncology* 41:723-728.
109. Tepel J and Haverkamp U (1993) Experimentelle Untersuchungen über die Schädigung menschlichen Zahnschmelzes durch ionisierende Strahlen. *Zeitschrift für Medizinische Physik* 3:71-75.
110. Thiel HJ (1989) Die Strahlenkaries. *Radiobiologie, Radiotherapie* 30:193-211.
111. Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FKL, Jansma J, Coppes RP (2003a) Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Critical reviews in oral biology and medicine* 14:213-225.
112. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP (2003b) Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Critical reviews in oral biology and medicine: An official publication of the American association of oral biologists* 14:199-212.
113. Vogel C, Kullmann W, Reichart P, Nusslin F (1981) In vitro studies of radiogenic caries in human dental enamel. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 36:314-316.
114. Vogel H and Gerthsen C (1999) Gerthsen Physik. 20. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
115. Wagner W, Kuffner HD, Hartmann U (1986) Patients undergoing radiotherapy as high risks in dental surgery. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 41:440-443.
116. Wang R and Weiner S (1998) Human root dentin: structural anisotropy and Vickers microhardness isotropy. *Connective tissue research* 39:269-279.
117. Wescott WB, Starcke EN, Shannon IL (1975) Chemical protection against postirradiation dental caries. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 40:709-719.

-
118. Wheater P, Burkitt H, Daniels V (1987) Funktional histology: a text and colour atlas. 2. Auflage, Urban & Schwarzenberg Verlag, Baltimore.
 119. Williams DB and Carter CB (1996) Transmission electron microscopie. Textbook for materials science, Springer Verlag, New York.
 120. Willich N, Gundacker K, Zwingers T, Rohloff R (1988) The development of radiation caries after high doses of irradiation. Strahlentherapie und Onkologie 164:466-473.
 121. Wöstmann B and Rasche KR. (1995) Einfluß einer Radiotherapie auf die Überlebenszeit von Zähnen und Zahnersatz. Zahnärztliche Welt 104:627-633.
 122. Xu HHK, Eichmiller FC, Smith DT, Schumacher GE, Giuseppetti AA, Antonucci JM (2002) Effect of thermal cycling on whisker-reinforced dental resin composites. Journal of materials science 13:875-883.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Professor Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die hervorragende, stetige Unterstützung während der praktischen Versuchsdurchführung und bei der Fertigstellung der Arbeit.

Frau Wiebke Hoth-Hannig, Laborleiterin MTA, sowie der medizinisch-technischen Assistentin Frau Dr. rer. nat. Natascha Umanskaya gilt mein Dank für die wissenschaftliche Betreuung bei den praktischen Versuchsdurchführungen.

Herrn Professor Dr. Markus Balkenhol danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Großer Dank gebührt auch meiner Kommilitonin Eva Hackethal für die stets hilfreiche tatkräftige Unterstützung bei den gemeinsamen Versuchsdurchführungen.

Folgenden Personen in auswärtigen Institutionen bin ich zu Dank verpflichtet:

Herrn Univ.-Professor Dr. Christian Rübe, Frau Prof. Dr. Claudia E. Rübe sowie Herrn Georg Blaß (MTRA), Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Bestrahlung der Zahnproben.

Herrn Dr. Gaebel, Facharzt für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Homburg/Saar für die freundliche Bereitstellung der Zahnpaare.

Herrn Norbert Pütz technischer Mitarbeiter, anatomisches Institut des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und Dr. Karsten Woll für ihre Geduld und Unterstützung während meines gesamten Studiums und im Rahmen der vorliegenden Dissertation danken.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben	Staatsangehörigkeit: deutsch Geburtsdatum : 07.05.1986 Geburtsort: Saarbrücken
Ausbildung	2010 zahnärztliche Prüfung – Gesamtnote: gut 2005-2010 Studium der Zahnmedizin am Universitätsklinikum des Saarlandes 2008 zahnärztliche Vorprüfung 2006 naturwissenschaftliche Vorprüfung 2005 Abitur (Note 1,6) 1996-2005 Gymnasium Marienschule in Saarbrücken ab 2000 mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
Weiterbildung	2010 Cerec 3D Seminar 2009 Vollkeramikfortbildung der Firma Ivoclar Vivadent
Sprachkenntnisse	Französisch (4 Jahre Schulausbildung) Englisch (7 Jahre Schulausbildung)
Beruf	Seit Juli 2011 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Hackethal in Morbach

Saarbrücken, 22.01.2013